

Aus dem Institut für Pathologie
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Nizze)

der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

**Kapillardichte und Kapillararchitektur als Prognosefaktor für das
kolorektale Karzinom**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt
von
Uwe Gringmuth
geb. 24.04.1972 in Berlin

Rostock, den 21.05.2008

Dekan

- 1. Gutachter: Frau Prof. Dr. med. A. Tannapfel**
- 2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. M. Barten**
- 3. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. W. Brinckmann**

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Untersuchungsziel.....	6
1.2.	Tumorangiogenese.....	7
1.3.	Methoden zur Darstellung von Gefäßen.....	8
1.4.	Immunhistochemische Färbung.....	11
1.5.	Mikroskopische Auswertung.....	12
1.6.	Gefäßparameter.....	13
1.7.	Zellzyklus.....	13
1.8.	Methoden zur Darstellung von proliferierenden Zellen.....	14
2.	Material und Methoden.....	16
2.1.	Untersuchungsmaterial.....	16
2.2.	Immunhistochemische Untersuchungen.....	19
2.3.	Qualitative und quantitative Auswertung	21
2.4.	Statistik	25
3.	Ergebnisse.....	26
3.1.	Gefäßdarstellung mit dem Antikörper gegen Faktor VIII.....	26
3.2.	Doppelmarkierung mit dem Proliferationsmarker Ki67 und Faktor VIII..	27
3.3.	Kapillardichte im kolorektalen Karzinom.....	28
3.3.1.	Kapillardichte der kolorektalen Karzinome in Abhängigkeit von klinischen und histopathologischen Daten.....	28
3.4.	Kapillardichte als prognostischer Faktor.....	35
3.5.	Kapillardichte in den Lebermetastasen.....	38
3.5.1.	Kapillardichte in den Lebermetastasen im Vergleich zu den in Primärtumoren.....	38
3.6.	Kapillararchitektur im kolorektalen Karzinom.....	39
3.6.1.	Kapillararchitektur der kolorektalen Karzinome in Abhängigkeit von klinischen und histopathologischen Daten.....	41
3.7.	Kapillararchitektur als prognostischer Faktor.....	43
3.8.	Kapillararchitektur in den Lebermetastasen.....	46
3.9.	Endothelzellproliferation.....	48

4.	Diskussion.....	49
5.	Zusammenfassung.....	67
6.	Literaturverzeichnis.....	70
7.	Anhang.....	

1. Einleitung

Das kolorektale Karzinom gehört zu den häufigsten bösartigen Tumoren der westlichen Welt. Es ist weltweit mit 678000 Neuerkrankungen und 394000 Sterbefällen pro Jahr (Statistisches Bundesamt 1998) zusammen mit dem Brustkrebs der dritthäufigste solide Tumor nach dem Magen- und dem Lungenkrebs (Boening und Warendorf 1991). In Deutschland ist das kolorektale Karzinom nach dem Lungenkrebs beim Mann und nach dem Brustkrebs der Frau die zweithäufigste Todesursache maligner Erkrankungen. Jährlich versterben an diesem Malignom durchschnittlich fast 35000 Menschen und 55000 Menschen erkranken neu in Deutschland (Schalhorn und Jauch 2000). Das Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, beträgt in Deutschland etwa 5% (Seifert 1988). Nach Nelson et al. (1999) stieg die Inzidenz in den letzten Jahrzehnten stetig an, um heute auf einem hohen Niveau, mit mittlerweile einem leicht rückläufigen Charakter, stabil zu sein. Allerdings liegt die mittlere 5-Jahres-Überlebenszeit immer noch nur bei ca. 50% (Rieken 1993). Männer erkranken in Deutschland im Mittel im Alter von 68,1 Jahren, Frauen hingegen mit 72,3 Jahren. Die dadurch verursachte Verkürzung der Lebenserwartung beträgt bei beiden Geschlechtern 6 Jahre (Krebs in Deutschland 1999).

Etwa 80% der kolorektalen Karzinome treten sporadisch auf. Hierbei werden eine komplexe Wechselwirkung von exogenen Faktoren und ein individuelles Risiko aufgrund der genetischen Prädisposition diskutiert. Als exogene Risikofaktoren gelten eine kalorien-, protein- und fettreiche, faser- und ballaststoffarme Ernährung, Rauchen (Neugut et al. 1993), hoher Alkoholkonsum, entzündliche Darmerkrankungen, wie eine lang bestehende Colitis ulcerosa (Porschen und Strohmeyer 1991) und Morbus Crohn (Connell et al. 1994), Hypergastrinämie (Ahnen 1991) oder andere Krebserkrankungen (Guillem und Brittis 1995). Auch bestimmte Zustände nach medizinischen Eingriffen wie nach Cholecystektomie (McFarlane et al. 1993), Uretrosigmoidostomie (Ahnen 1991) und nach Radiatio (Steele und Mayer 1995) werden als Risikofaktoren beschrieben. Als protektive Faktoren gelten dagegen Vitamine (A, C, E), Selen (Ferraroni et al. 1994), Calcium (Sorenson et al. 1988), körperliche Aktivität (White et al. 1996) und nicht-steroidale Antiphlogistika (Thun et al. 1991).

Für etwa 20% der kolorektalen Karzinomfälle ist eine familiäre Häufung nachzuweisen. Für annähernd 5-6% der Fälle lässt sich eine rein genetische Ursache im Sinne einer exakt definierbaren, hereditären Erkrankung nachweisen. Zu nennen sind hier die familiäre adenomatöse Polyposis (Bulow 1987), das Turcot-Syndrom (Hamilton et al. 1995) und das

hereditäre nicht polypöse kolorektale Karzinom-Syndrom (Lynch-Syndrom) (Lynch et al. 1993).

Zwischen den ersten Veränderungen der Schleimhaut, infolge schädigender Faktoren und dem Auftreten der ersten kolorektalen Krebszellen, liegt ein Zeitraum von vermutlich 10-20 Jahren. Weitere 10-20 Jahre vergehen bis zur Manifestation eines Karzinoms (Hermanek 1992). Der überwiegende Anteil der kolorektalen Karzinome entwickelt sich aus einem kolorektalen Adenom. Sein Vorkommen erhöht das Risiko des Auftretens eines kolorektalen Karzinoms (Neugut et al. 1993). Das Malignitätspotential eines Adenoms ist abhängig vom histologischen Typ (tubulär, tubulovillös oder villös), von der Größe und vom Grad der Dysplasie (Armitage 1991). Insgesamt liegt das kumulative Risiko einer karzinösen Transformation eines Adenoms nach einem Beobachtungszeitraum von 5 Jahren bei 2,5%, nach 10 Jahren bei 7,5% und nach 20 Jahren bei 25% (Riede und Schaefer 1993).

Die Transformation der normalen Darmschleimhaut über das Adenom zu einem Karzinom ist die Folge von molekularen Veränderungen des Genoms (Vogelstein et al. 1988). In der Karzinogenese werden ein komplexer Ablauf und Wechselwirkungen diskutiert, einerseits durch aktivierte Onkogenen (K-ras-, c-myc-Mutation) und andererseits durch den Verlust einer Reihe von Tumor-Suppressor-Genen (DCC-, p53-, APC-, MCC-, GAP-Mutation), was zu einer vermehrten Zellproliferation, verminderten Apoptoserate und zum Adhäsionsverlust führt (Cawkwell und Quirke 1996). Allerdings muss nicht jede Tumorzelle die aufgeführten Mutationen aufweisen (Kinzler und Vogelstein 1998).

Makroskopisch zeigt sich das kolorektale Karzinom ulcerös, polypös, ringförmig oder diffus infiltrierend. Mikroskopisch sind über 70% der Fälle Adenokarzinome, ca. 20% gehören zu den verschleimenden, muzinösen Karzinomen und weniger als 10% stellen andere histologische Typen dar.

Weiterhin werden kolorektale Karzinome mikroskopisch in vier Differenzierungsgrade als gut-, mäßig-, gering- und undifferenziert eingestuft.

Die Karzinome sind zu 69% im Kolon und zu 31% im Rektum zu finden, im Kolon wiederum zu 35% im Sigmoideum, zu 22% im Coecum, zu 12% im Kolon ascendens, zu 10% im Kolon transversum und zu 7% im Kolon descendens (Coates et al. 1995).

Das kolorektale Karzinom breitet sich per continuitatem lokal von der Mucosa durch alle Wandschichten in das perirektale oder perikolische Fettgewebe und darüber hinaus durch direkte Infiltration oder kavitärer Dissemination in Nachbarstrukturen aus. Durch den Einbruch in die Lymphbahnen und in die Venen erfolgt eine Ausbreitung auf lymphogenem und hämatogenem Weg (Rieken 1993). Dabei findet in absteigender Reihenfolge eine Absiedlung in Leber, Peritoneum und Lunge sowie ferner in Knochen, Gehirn und seltener auch in anderen Organen statt (Schalhorn und Jauch 2000). Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sind 40% der kolorektalen Karzinome noch nicht metastasiert und auf die Darmwand beschränkt. Ungefähr ein Drittel der Fälle weisen Lymphknotenmetastasen auf und 20% der Rektumkarzinome sowie 30% der Kolonkarzinome haben bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose nachweislich Fernmetastasen abgesiedelt (Hermanek et al. 1994).

Die Prognose des kolorektalen Karzinoms ist wesentlich abhängig von der primären Tumorausdehnung, vom Auftreten lymphogener und hämatogener Metastasen bzw. von lokalen Rezidiven, vom Differenzierungsgrad, vom histologischen Typ, sowie von der Resektabilität des Tumors (Hermanek 1997; Chapuis et al. 1985; Korenaga et al. 1991). Ferner konnte auch ein Einfluss des Chirurgen auf die postoperative Morbidität und Letalität (Midgley und Kerr 2000) sowie auch auf die 5-Jahres-Überlebensrate (Hermanek et al. 2000) nachgewiesen werden.

Die oben genannten etablierten Prognosefaktoren finden teilweise ihren Ausdruck in der gebräuchlichen Einteilung der kolorektalen Karzinome, die von der UICC (International Union Against Cancer) vorgegebenen TNM-Klassifikation. Diese Klassifikation beschreibt das kolorektale Karzinom nach seiner lokalen Ausbreitung (pT), eventuellen Lymphknotenmetastasen (pN) bzw. Fernmetastasen (M). Die Stadieneinteilung auf der Basis der TNM-Klassifikation bietet ein überschaubares und einheitliches Prognosesystem für den Verlauf der kolorektalen Karzinome. So liegt die 5-Jahres-Überlebensrate beim Vorliegen eines lokalisierten kolorektalen Karzinoms im Stadium I bei 90%, im metastasierten Stadium IV hingegen nur noch bei 6% (Graeven und Schmiegel 2000). Allerdings lassen sich auch innerhalb der einzelnen Tumorstadien sehr unterschiedliche Krankheitsverläufe beobachten.

Nach Erstdiagnose können ca. 70-80% der Patienten kurativ behandelt werden. Ohne nachfolgende Behandlung treten aber im Verlauf bei ungefähr der Hälfte dieser Patienten, trotz vollständiger Resektion des Primärtumors, Metastasen des kolorektalen Karzinoms auf (Graeven und Schmiegel 2000). Dies lässt sich damit erklären, dass bereits zum Zeitpunkt der

Operation des Primärtumors eine klinisch nicht erkennbare Mikrometastasierung stattgefunden hat. Mit einer adjuvanten Therapie wird versucht, diesen Mikrometastasen entgegenzuwirken, mit dem Ziel, die Manifestation der metachronen Metastasen oder auch der Lokalrezidive zu verhindern. Mehrere groß angelegte, prospektive, klinische Studien zeigten eine Reduktion der Rezidivrate und ein längeres Überleben bei Patienten mit einer adjuvanten Therapie gegenüber Patienten ohne adjuvanten Therapie (Wolmark et al. 1999). Somit ist unter Berücksichtigung des Nebenwirkungs-Nutzen-Profiles eine klare Indikation zur adjuvanten Therapie nach Primärresektion eines kolorektalen Karzinoms im Stadium III gegeben. Der Vorteil einer adjuvanten Therapie ist allerdings bisher nur für das Stadium III, nicht aber für das Stadium II, durch Studien gesichert (IMPACT B2 1995; Mamounas et al. 1999). Bei Patienten mit einem kolorektalen Karzinom im Stadium II stellt sich die Frage, welcher dieser Patienten von einer adjuvanten Therapie profitiert. Um eine genauere Unterscheidung von Risikogruppen insbesondere im Stadium II zu ermöglichen, benötigt man neben der TNM-Einteilung zusätzliche histomorphologische oder molekularbiologische Marker, die es erlauben, den Verlauf vorherzusagen.

Hier zeigt sich der Bedarf nach neuen Prognosefaktoren, welche eine Differenzierung der einzelnen Stadien zulassen und somit eine gezieltere und effizientere Therapieplanung ermöglichen. Daraufhin wurde eine Reihe von Faktoren auf ihre prognostische Wertigkeit hin untersucht. So werden beispielsweise als wahrscheinlicher Prognosefaktor ein erhöhter CEA-Serum-Spiegel, die peritumoröse lymphozytäre Infiltration, die Lokalisation des Primärtumors (tiefes Rektum) und die Lymphgefäß- und Nervenscheideninvasion diskutiert. Auch dem Nachweis oder der erhöhten Expression von einigen Onkogenen (ras, EGFR, c-myc, c-erbB2, TGF β -1) und / oder Tumorsuppressorgenen (p53, DCC, p27) werden eine mögliche Bedeutung für die Prognose zugesprochen (Compton et al. 2000; Hermanek et al. 2000; Midgley und Kerr 2000). Jüngste Studien berichteten über einen günstigen klinischen Verlauf bei Kombinationen mehrerer Faktoren, wie beispielsweise das Vorhandensein einer hohen CD-8 positiven Lymphozyteninfiltrationsrate bei Tumoren mit Mikrosatelliten-Instabilität (Prall et al. 2004).

Eine weitere Überlegung ist, dass Wachstum, Metastasierung und Therapie eines Tumors von seiner Gefäßversorgung abhängen. Schon 1907 wurde ein Zusammenhang zwischen der Tumordurchblutung und der Metastasierung beschrieben (Goldman 1907). So ist ein Rückgang der Zellproliferationsrate bei mangelnder Gefäßausstattung des Tumors, durch eine

insuffiziente Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen und einem unzureichenden Abtransport von Stoffwechselmetaboliten zu verzeichnen (Tannock 1968; 1970). Mit einer steigenden Gefäßdichte nimmt die Wahrscheinlichkeit zu, dass Tumorzellen in den Körperkreislauf absiedeln. Darüber hinaus ist der Wirkungsgrad einer Chemo-, Radio- oder Hyperthermietherapie von der Tumervaskularisation abhängig (Jain 1988).

Aus diesem Grund konzentrierten sich einige Untersuchungen darauf, die Blutversorgung der Primärtumoren zu analysieren und einen Zusammenhang zum klinischen Verlauf festzustellen. Die ersten wesentlichen und richtungsweisenden Arbeiten lieferte die Arbeitsgruppe um Weidner et al. (1991; 1992) an Mammakarzinomen. Nach immunhistochemischer Färbung der Endothelzellen zählten sie die Mikrogefäße an den Orten der höchsten Kapillardichte, den sogenannten „hot spots“, bei einer 200fachen Verstärkung (Gesichtsfeldgröße $0,74 \text{ mm}^2$). Diese Studien zeigten, dass eine hohe Dichte von Kapillaren mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Diesen Zusammenhang deuteten Weidner et al. (1991) so, dass Karzinome, die ein höheres Potential zur Neoangiogenese besitzen, schneller wachsen und häufiger metastasieren.

Viele Untersuchungen folgten den Überlegungen von Weidner et al. (1991). Dabei konnten die Ergebnisse am Mammakarzinom von Bosari et al. (1992) und Fox et al. (1995) bestätigt werden. Auch andere Tumoren wurden auf diese Hypothese überprüft. So ist für das maligne Melanom (Srivastava et al. 1988; Vacca et al. 1993), das Prostatakarzinom (Fregene et al. 1993), das Bronchialkarzinom (Macchiarini et al. 1992; 1994) und andere Tumoren gezeigt worden, dass ähnlich dem von Weidner et al. (1991; 1992) untersuchten Mammakarzinomen auch hier eine hohe Kapillardichte eher mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist.

Auch für das kolorektale Karzinom gibt es Untersuchungen über die Kapillardichte als prognostischen Faktor. Die Ergebnisse dieser Arbeiten sind aber sehr unterschiedlich und zum Teil gegensätzlich. Einige Studien zeigten in univariaten und multivariaten Analysen einen klaren statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen einer hohen Kapillardichte und einem schlechteren klinischen Verlauf (Saclarides et al. 1994; Takebayashi et al. 1996; Tanigawa et al. 1997; Tomisaki et al. 1996; Vermeulen et al. 1995). Andere Autoren sehen diesen Zusammenhang nicht (Bossi et al. 1995; Pavlopoulos et al. 1998; Sternfeld et al. 1999) und einige wiederum wiesen in ihren Arbeiten, entgegengesetzt zum vorgenannten, einen

signifikanten Zusammenhang zwischen niedriger Kapillardichte und schlechtem prognostischen Verlauf nach (Abdalla et al. 1999; Lindmark et al. 1996).

Pavlopoulos et al. (1998) deuteten in ihrer Arbeit darauf hin, dass nicht die Kapillardichte einen prognostischen Faktor darstellt, sondern eher die Qualität der Kapillarverteilung. Es wurde darauf hingewiesen, dass die Kapillararchitektur in der normalen Mucosa erheblich von der in Karzinomen abweicht. Auch Jain (1988) sowie Rubin und Casarett (1966) legten in ihren Arbeiten dar, dass die Tumordurchblutung auch von der Kapillararchitektur beeinflusst wird. Konerding et al. (2001) sahen in metastasierten kolorektalen Karzinomen gegenüber nicht metastasierten eine auffallend unregelmäßige Kapillararchitektur mit einer geringen intervaskulären Distanz zwischen den Kapillaren.

1.1. Untersuchungsziel

Ziel der vorliegenden Studie ist es, am eigenen Krankengut von 173 Patienten, unter der Verwendung der Methode von Weidner et al. (1991), einen prognostischen Einfluss der Kapillarisation in kolorektalen Karzinomen zu überprüfen und mögliche Ursachen für die sehr stark variierenden Ergebnisse in der Literatur zu diskutieren.

Zur Einschätzung der Vaskularisation soll einerseits die Auszählung der Kapillaren in den „hot spots“ der Tumoren als ein rein quantitativer Parameter dienen. Ob auch die qualitativen Eigenschaften der Kapillaren, wie Form und Wachstumsmuster, einen prognostischen Aussagewert haben, soll andererseits durch die Analyse der Kapillararchitektur in Anlehnung an Pavlopoulos et al. (1998) beurteilt werden.

Ergänzend werden die Kapillaren in Lebermetastasen von kolorektalen Karzinomen untersucht, mit der Frage, wie die kapilläre Dichte und Architektur in den Lebermetastasen im Vergleich zu der in primären kolorektalen Karzinomen ist.

Ferner soll in einer kleineren Stichprobe gezeigt werden, dass das kolorektale Karzinom tatsächlich zu den Tumoren mit einer gesteigerten Neoangiogenese zählt. Dazu dient der Vergleich der Endothelzellproliferation in gesunder Mucosa und im Tumor, dargestellt durch eine immunhistochemische Doppelmarkierung mit dem Proliferationsfaktor Ki67 und dem Faktor VIII.

1.2. Tumorangiogenese

Für das Wachstum, den Antransport von Sauerstoff und Nährstoffen sowie den Abtransport von Stoffwechselendprodukten benötigt das Tumorgewebe Blutgefäße. In der initialen Phase der Tumorentstehung erfolgt die Versorgung der Tumorzellen durch Diffusion aus den präformierten Gefäßen (Folkman 1974). Allerdings ist die Versorgung durch einen gesteigerten Stoffwechselbedarf bei progredientem Tumorwachstum nicht mehr ausreichend, so dass eine Steigerung des Blutflusses durch Erweiterung der bereits existierenden Gefäße oder durch Bildung neuer Kapillaren erfolgen muss. Eine solche tumorinduzierte Neoangiogenese wurde erstmals von der Arbeitsgruppe um Algire und Chalkey (1945) mit Hilfe der „transparent chamber technique“ an lebenden Versuchstieren beschrieben.

Ab einer Größe von wenigen Kubikmillimetern ($1-2 \text{ mm}^3$) ist das Tumorwachstum von seiner Neoangiogenese abhängig (Pluda 1997). Die Neubildung von Gefäßen ist wiederum von sogenannten Angiogenesefaktoren abhängig (Folkman 1974), welche von den Tumorzellen induziert und von Makrophagen gebildet werden (Polverini und Leibovich 1984). Der Tumor produziert angiogenetische (z.B. VEGF/VPF, PD-ECGF, FGF, Angiotropin) und antiangiogenetische (z.B. Angiostatin, Thrombospondin) Faktoren. Stellt sich ein Gleichgewicht zwischen diesen Faktoren sowie zwischen der Tumorproliferation und der Apoptose ein, führt dies zum Wachstumsstillstand des Tumors, zum sogenannten „dormancy“ (Holmgren et al. 1995). Durch eine Gewebhypoxie kommt es über die Wirkung eines „hypoxia inducible factor (hif)-1a“, durch Phosphorylierung und Bindung an „Hypoxie regulierende Elemente“ der DNA, zur vermehrten Synthese von Angiogenesefaktoren z.B. VEGF (Bunn und Poyton 1996). Diese führen zu einem Ungleichgewicht zwischen stimulierenden und hemmenden Gefäßfaktoren, dem so genannten „angiogenic switch“ (Feldmann et al. 1993). Es bilden sich neue Gefäße und der Tumor wächst.

Diese durch eine Gewebhypoxie induzierte Neoangiogenese kann durch Onkogene wie das K ras-Gen oder einer p53-Mutationen verstärkt und erhalten werden. Zellen, die ein K ras-Gen vorweisen, reagieren auf eine Hypoxie mit einer verstärkten Synthese von Angiogenesefaktoren wie dem vascular endothel growth factor (VEGF) (Mazure et al. 1996). Eine p53-Mutation verstärkt die Tumorangiogenese durch eine verminderte Synthese des Angiogenese-Inhibitors Thrombospondin und eine verstärkte Synthese von VEGF (Gasparini et al. 1994). Durch die gesteigerte Synthese angiogenetischer Faktoren kommt es im Tumorgewebe zu einer vierzig- bis fünfzigfach schnelleren Neoangiogenese als im

Normalgewebe (Yamaura und Sato 1974). Dieses schnelle Wachstum der Gefäße führt zu einigen besonderen Charakteristika der Tumorgefäße (Rubin und Casarett 1966).

Die Tumorangio-genese setzt in einer frühen Phase des Tumorwachstums ein. Es fehlt weitestgehend eine Differenzierung der Gefäße in Venen und Arterien (Algire 1954; Folkman 1974). Die neu gebildeten Gefäße zeigen eine unregelmäßige Anordnung. Typisch sind Kalibersprünge und Gefäßabbrüche. Es finden sich viele Kapillarschlingen und Kapillarknospen. Sie sind häufig dilatiert, aneurysmatisch erweitert und bilden Sinusoide. Die Basalmembran ist fragmentiert oder nicht vorhanden. Eine Gefäßmuskulatur ist kaum ausgebildet (Algire 1954; Algire und Chalkley 1945; Endrich et al. 1988; Rubin und Casarett 1966; Tanaka 1974; Warren 1979). Tumorgefäße besitzen keine Nervenversorgung und entziehen sich daher der nervalen, hormonellen und metabolischen Regulation (Endrich et al. 1988). Die Gefäßverteilung und die Blutversorgung innerhalb des Tumors sind heterogen (Jain 1991).

1.3. Methoden zur Darstellung von Gefäßen

Es existiert eine Vielzahl von Möglichkeiten, Gefäße darzustellen, wie die Radiographie, Szintigraphie, Injektionsmethode, histochemische und immunhistochemische Färbungen, Licht- und Elektronenmikroskopie, Ausgusstechniken sowie neuere Möglichkeiten zu intravitalen Beobachtungen, wie z.B. die dynamische Magnetresonanztomographie, die dynamischen Computertomographie, die Positronen-Emissions-Tomographie und die Color-Dopplersonographie (Feldmann et al. 1993; Jain 1988; Laubenbacher und Schwaiger 1998; Sohn et al. 1992).

Allerdings soll hier nur eine kurze Darstellung derjenigen Methoden erfolgen, welche häufig in der Literatur zur Darstellung von Gefäßen angewendet wurden. Zu denen zählen neben der Injektionsmethode und histochemischen Färbung vor allem die immunhistochemischen Darstellungsmethoden.

Bei der Injektionsmethode versucht man, durch in vivo- aber auch in vitro-Punktion eines tumorzuführenden Gefäßes mit folgender Injektion von Farbstoffen, Kontrastmittel, Makromolekülen oder radioaktiv markierten Erythrozyten die Tumorgefäße szintigraphisch oder radiologisch funktionell sowie morphologisch anhand von Schnittpräparaten oder direkt in „transparent chamber technique“ zu beurteilen (Rubin und Casarett 1966; Tanaka 1974; Tannock und Steel 1969)

Bei der Injektionsmethode ist zu beachten, dass sie aus ethischen Gründen überwiegend dem tierexperimentellen Bereich zuzuordnen ist. Weiterhin kann es durch die unter Druck injizierte Substanz, bedingt durch die Vulnerabilität der Tumorgefäße und die mangelnde Basalmembranauskleidung, häufig zu Gefäßläsionen bzw. zur Eröffnung von kollabierten Gefäßen sowie zu einer Extravasation der injizierten Substanzen kommen. Dadurch ist die Auswertung erschwert und kann teilweise verfälscht werden (Papadimitriou und Woods 1975).

Histochemisch lässt sich durch eine Enzymreaktion die in den Endothelzellen enthaltene alkalische Phosphatase mit Hilfe einer Diazo-Färbemethode nachweisen (Stutte 1967). Dabei zeigen Endarterien und Kapillaren eine intensive Färbung, hingegen größere Gefäße und Gefäße des venösen Schenkels nur eine schwache bis fehlende Farbreaktion aufweisen (Mlynek et al. 1985). Neben der Gefäßanfärbung zeigt sich allerdings auch eine inhomogene Stromaanfärbung. Diese ist besonders ausgeprägt bei jungen Stromazellen, wie sie in malignen Tumoren sowie bei Entzündungsreaktionen häufig vorkommen. Somit wird eine Gefäßbeurteilung in Tumoren eingeschränkt (Porschen et al. 1989; Mlynek et al. 1985; Stutte 1967).

Immunhistochemisch konnten zahlreiche Antikörper, welche mehr oder weniger die Oberflächenstrukturen der Gefäße markieren, gefunden werden. Auch hier soll eine kurze Darstellung derjenigen Antikörper erfolgen, die häufig in der Literatur zur Darstellung von Gefäßen angewendet wurden.

So stellten Schlingemann et al. (1995) den monoklonalen Antikörper PAL-E vor, der das Endothel von Kapillaren und von mittleren und kleinen Venen markiert. Arterien, Arteriolen und große Venen zeigen nur eine schwache, Lymphgefäße keine Reaktion. Darüber hinaus werden die Epitope von Endothelzellen, welche von diesem Antikörper erkannt werden, bei der Formalinfixierung und Paraffineinbettung zerstört, so dass der PAL-E nur an Gefrierschnitten angewandt werden kann (Porschen et al. 1989; Ruiter et al. 1989; Schlingemann et al. 1985).

Mit dem *Ulex europaeus* Agglutinin I (UEA I) lassen sich mit Hilfe eines spezifischen Lektins die alpha-L-Fucose-Reste von Zuckerverbindungen in Gefäßendothelien darstellen (Miettinen et al. 1983). Dabei werden Kapillaren und kleinere Gefäße im normalen und entarteten Gewebe zuverlässig angefärbt. Größere Gefäße kommen nicht eindeutig zur

Darstellung (Fujime et al. 1984). Es werden neben den Blutgefäßen auch Lymphgefäße angefärbt (Fujime et al. 1984; Porschen et al. 1989). In den Arbeiten von Matsushita et al. (1985) sowie von Ordonez und Batsakis (1984) stellte sich dar, dass das UEA I auch zu einer Anfärbung von neoplastischen Zellen unter anderem auch im kolorektalen Karzinom führte. Ferner berichteten einige Arbeiten über eine unregelmäßige Anfärbung mit Arealen fehlender Farbreaktion (Alles und Bosslet 1988) und teilweise fanden sich Färbungen in Periozyten und im Zytoplasma von Granulozyten (Mlynek et al. 1985; Porschen et al. 1989).

Durch Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit der Oat-75-Zellreihe menschlicher kleinzelliger Bronchialkarzinome gelang es, den monoklonalen IgG Antikörper BW 200 zu isolieren, der gegen ein Epitop an einem Glykoprotein menschlicher Endothelzellen gerichtet ist. Dabei reagiert dieser mit Endothelzellen neoplastischen und nicht neoplastischen Ursprungs. Es kommt unter Anwendung der Immunperoxidase-Technik zu einer deutlichen Färbung der Zellmembran und zu einer granulären Reaktion im Zytoplasma arterieller, kapillärer und venöser Endothelzellen, wobei der arterielle Schenkel stärker angefärbt wird als der venöse (Alles et al. 1986). Er ist gleichfalls an Gefrierschnitten wie an Paraffinschnitten anwendbar.

Die in der Literatur gebräuchlichsten immunhistochemischen Methoden Gefäße darzustellen, ist die mit Hilfe der Antikörper gegen CD31, CD34, VEGF und Faktor VIII (von Willebrand Faktor). Das letztere vom Hasen stammende Anti-Human-Serum markiert ein Endothelzellenprodukt, welches F VIII rAg (Faktor VIII related antigen) genannt wurde (Mukai et al. 1980). Mit dem Antikörper gegen F VIII kommt es zu einer gleichmäßigen Anfärbung aller Gefäße in normalem und neoplastischem Gewebe (Mukai et al. 1980). Er lässt sich neben Gefrierschnitten auch an Paraffinschnitten anwenden und eignet sich daher für retrospektive Untersuchungen (Alles und Bosslet 1988; Ruiter et al. 1989).

Neben den Gefäßen lässt sich F VIII rAg auch in Megakaryozyten und in Thrombozyten nachweisen. Undifferenzierte Endothelien von Angiosarkomen und Lymphangiomen werden nicht zuverlässig dargestellt (Alles und Bosslet 1988; Little et al. 1986).

Andere immunhistochemische Darstellungsmethoden wie die Markierung mit Anti CD36, EN-4 und 7/44, E9, TEC-11, 4A11, H4/18 und FB5 wurden nur selten in der Literatur angewandt. Somit führen sie nicht zu einer Vergleichbarkeit der Studien und sollen an dieser Stelle nicht weiter erläutert werden.

1.4. Immunhistochemische Färbung

Zur optischen Darstellung des gegen das entsprechende Antigen gerichteten Antikörpers werden die Möglichkeiten der Immunfluoreszenztechnik und die der immunhistochemischen Technik genutzt. Bei der ersten Methode markiert man den Antikörper, der an das Antigen bindet, mit einem fluoreszierenden Substrat und kann dieses durch fluoreszierendes Licht darstellen. Bei der zweiten werden durch Konjugation des Antikörpers mit einem Markerenzym, welches mit Hilfe eines Chromogens eine Farbreaktion katalysiert, die markierten Antigene gefärbt. Die immunhistochemische Technik unterscheidet sich gegenüber der Fluoreszenztechnik dadurch, dass die Präparate durch ein gewöhnliches Lichtmikroskop bewertet werden und damit auch morphologische Aspekte betrachtet werden können. Des weiteren ist die Färbung stabil und die Präparate damit archivierbar (Taylor 1978).

Immunhistochemisch kann man die direkte von der indirekten Technik unterscheiden. Bei der direkten Technik ist der primäre, an das Antigen bindende Antikörper direkt mit einem Markerenzym konjugiert, bei der indirekten dagegen bleibt der primäre Antikörper unkonjugiert. Erst in einem zweiten Arbeitsgang wird der sekundäre Antikörper mit dem Markerenzym konjugiert. Die Farbreaktion lässt sich durch einen tertiären, enzymmarkierten Antikörper in der so genannten Drei-Stufen-Technik oder Sandwich-Technik intensivieren. Als Enzym stehen die Meerrettichperoxidase (POX) oder die alkalische Phosphatase (AP) zur Verfügung. Durch die indirekte Methode gewinnt man eine höhere Sensitivität (Sternberger und Sternberger 1986).

Weiterhin lässt sich die Brückenantikörpermethode abgrenzen. Bei dieser wird der unkonjugierte, primäre Antikörper durch einen unkonjugierten Brückenantikörper mit einem tertiären, enzymtragenden Antikörper aus derselben Tierspezies des primären Antikörpers verbunden.

Die sogenannte Peroxidase Antiperoxidase Methode (PAP) oder Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase Methode (APAAP) sind eine Sonderform der Brückenantikörpermethode (Charpin et al. 1988). Hier bindet statt des konjugierten, tertiären Antikörpers ein Peroxidase-Antiperoxidase-Komplex oder entsprechend ein Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase Komplex an den Brückenantikörper. Somit kommt es zu einer sehr geringen Hintergrundfärbung.

Bei der Avidin-Biotin-Methode wird nach Markierung des darzustellenden Antigens durch den primären Antikörper, ein sekundärer, mit Biotin konjugierter Antikörper verwendet. In

einem dritten Arbeitsschritt kommt es zur Kopplung mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex oder Avidin-Biotin-Alkalische Phosphatase Komplex. Das Glukoprotein Avidin zeigt eine starke Affinität zu Biotin. Die Hintergrundfärbung ist gering (Matsumura et al. 1989).

Für die Farbreaktion bei der Peroxidase-Methode benötigt man zusätzlich Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Substrat und Elektronendonator. Durch die Reaktion mit dem Chromogen 3,3 Diaminobenzidin wird ein braunes Farbprodukt erreicht.

Die im Gastrointestinaltrakt vorhandene endogene alkalische Phosphatase, aber auch die überwiegend in roten und weißen Blutkörperchen vorkommende endogene Peroxidase, können zu einer unerwünschten Begleitfärbung führen (Shields et al. 1984). Diese Begleitfärbung kann weitestgehend verhindert werden durch eine Hemmung der Peroxidase oder alkalischen Phosphatase in einem vorausgehenden Arbeitsschritt. Dabei lässt sich die endogene Peroxidase mit Methanol-Peroxid oder Glucoseoxidase (Köller et al. 1986), die endogene alkalische Phosphatase durch Levamisol hemmen.

1.5. Mikroskopische Auswertung

Die Auswertung der immunhistochemischen Reaktion kann nach zwei unterschiedlichen Prinzipien erfolgen, einerseits die Methode nach einem zufällig gewählten Auszählungsort, andererseits die Betrachtung der Kapillaren am Ort der höchsten Gefäßdichte, die so genannte „hot spot“ Methode.

Bei der zufälligen Gesichtsfeldauswahl wird mit Hilfe der Punkt-Treffer-Methode nach Chalkley (1943) ein in das Okular eingelassenes Netzgitter, das sich auf das Präparat projiziert, mäanderförmig das ganze Präparat durchgemustert (systematic sampling). Dabei wird als Treffer gezählt, wenn die zu untersuchende Struktur mit einem Netzgitter-Kreuzungspunkt zusammentrifft. Der mäanderförmige Vorschub ist dabei je nach Präperategröße so definiert, dass die Anzahl der Messungen repräsentative Werte erreichen (Chalkley 1943). Durch das so genannte „systematic sampling“ vermeidet man Wiederholungsmessungen und erreicht eine vollständige Durchmusterung des Gewebeschnittes ohne Beachtung der intratumoralen Heterogenität. Die Auszählungspunkte sind dabei zufällig über das Präparat verteilt (Weibel 1979; Chalkley 1943).

Davon abzugrenzen ist die von Weidner et al. (1991) erstmalig benutzte „hot spot“ Methode, bei der ausschließlich die Orte der höchsten Kapillardichte betrachtet werden. Diese Methode

geht von der Theorie aus, dass gerade in den besonders stark vaskularisierten Gebieten die Tumorzellen zur Neoangiogenese und damit verbunden zum schnelleren Wachstum und zur schnelleren, hämatogenen Metastasierung fähig sind. Auch bei der „hot spot“ Methode lassen sich mit Hilfe eines Netzgitters und der Punkt-Treffer-Methode die Gefäße auszählen. Eine andere Möglichkeit ohne Netzgitter wäre die vollständige Auszählung aller kapillären Gefäße in einem Gesichtsfeld innerhalb eines „hot spots“.

1.6. Gefäßparameter

Zur Beschreibung der Vaskularisation eines Gewebes oder eines Tumors am histologischen Präparat wurden unterschiedliche Gefäßparameter wie Anzahl, Länge, Durchmesser, Umfang, Oberfläche und Volumen der Gefäße verwendet. Dabei werden das Gefäßvolumen, die Gefäßlänge und die Gefäßoberfläche pro Gewebevolumeneinheit nach stereologischen Methoden aus den quantitativ erfassbaren Daten wie Anzahl der Gefäße pro Fläche, Durchmesser und Umfang der Gefäßanschnitte berechnet (Weibel 1963). Weibel et al. stellten 1963 zusätzlich eine direkte Methode zur Bestimmung der Gefäßoberflächendichte vor, die linear-intercept-Methode. Diese basiert auf dem Prinzip, dass die Schnittpunkte sich zu der Länge einer Linie, welche zufällig auf einem Gewebeschnitt hin und her gezogen wird, genauso verhalten, wie die Oberfläche der beobachteten Objekte zum Gewebevolumen. Damit kann die Oberfläche dreidimensionaler, komplexer Strukturen, welche auch inhomogen verteilt sind, direkt gemessen werden (Weibel 1963).

1.7. Zellzyklus

Um zu beurteilen, ob das kolorektale Karzinom zu den Tumoren mit Neoangiogenese gehört, soll die Proliferationsaktivität der Endothelzellen im Tumor mit der in normaler Mucosa verglichen werden.

Zur Darstellung proliferierender Zellen bedarf es Grundkenntnisse zu ihrem Zellzyklus. Der Zellzyklus jeder humanen Zellart lässt sich in 4 Phasen unterteilen. In der G1-Phase, auch Wachstumsphase genannt, werden zelleigene Proteine für die folgende DNA-Synthese gebildet. In der S-Phase wird die DNA synthetisiert und verdoppelt. Die nachfolgende G2-Phase ist die prämitotische Phase, welche zur Mitose führt. Nach der Mitose treten die Zellen entweder wieder in den Zellzyklus mit ein, also in die G1-Phase, oder werden zu ruhenden Zellen in der G0-Phase. Zellen in der G0-Phase können Stunden bis Monate in dieser ruhen bis sie wieder in die Wachstumsphase eintreten. Andere Zellen verlassen den Zellzyklus in der G0-Phase, differenzieren sich zu bestimmten Aufgaben und gehen danach zugrunde.

Somit zählen die Zellen der G1-, G2-, S- und Mitosephase zu den proliferierenden Zellen und die in der G0-Phase sowie die differenzierten Zellen zu den nicht proliferierenden Zellen einer Zellpopulation. Die Wachstumsfraktion ist dabei der Quotient aus proliferierenden Zellen zur Gesamtzahl der Zellen (Mendelson 1960).

Zu beachten ist, dass der Zellzyklus von Zellart zu Zellart unterschiedlich lang sein kann. Auch die einzelnen Zyklusphasen unterscheiden sich in ihrer Zeitdauer, so ist die S-Phase immer länger als die Mitose (Quinn und Wrigth 1990).

1.8. Methoden zur Darstellung von proliferierenden Zellen

Bei der Mitosezählung wird der Mitoseindex bestimmt. Man setzt den Anteil, der sich in der Mitose befindlichen Zellen, zur Gesamtzellanzahl in Bezug. So lässt sich am histologischen Präparat lichtmikroskopisch eine Aussage über den Anteil mitotischer Zellen machen.

Die Durchflusszytometrie ist ein fluoreszierendes Verfahren. Eine Zellsuspension aus einem frischen Gewebeschnitt, aber auch aus Parafinschnitten, wird mit DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und an einer Lichtquelle mit einer Flussrate von 1000 Zellen pro Sekunde vorbeigeführt. Die dabei entstehenden Fluoreszenzen und Lichtstreuungen werden registriert und mit Hilfe eines Computers wird die Verteilung der Zellen im Zellzyklus und damit auch der Anteil der proliferierenden Zellen von allen gezählten Zellen graphisch dargestellt (Coon et al. 1987).

Autoradiographisch lassen sich an Frischpräparaten durch Markierung mit radioaktivem Tritium-Thymidin (^3H -Thymidin) die proliferierenden Zellen in der S-Phase darstellen. Inkubiertes ^3H -Thymidin wird in der S-Phase des Zellzyklusses in die DNA der proliferierenden Zellen eingebaut (Wright und Alison 1984). Autoradiographisch kann so der ^3H -Thymidin-Labeling-Index (3HTLI) aus dem Verhältnis markierter zu allen gezählten Zellen ermittelt werden (Tannock 1978).

Die Proliferationsaktivität lässt sich auch immunhistochemisch ermitteln. Gratzner entwickelte 1982 einen monoklonalen Antikörper gegen Bromdesoxyuridin (BrdU). Dieses ist ein halogeniertes Pyrimidinanalogon, das vergleichbar mit dem ^3H -Thymidin während der S-Phase in die DNA der inkubierten Zelle eingebaut wird. Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers gegen BrdU können die Zellen, welche sich zum Zeitpunkt der in vivo oder in vitro Inkubation von BrdU in der S-Phase des Zellzyklus befinden, markiert und mit der

Immunperoxidasetechnik gefärbt sowie lichtmikroskopisch ausgewertet werden (Gratzner 1982).

1983 stellten Gerdes et al. erstmalig den in Mäusen gezüchteten monoklonalen Antikörper gegen Ki67 vor. Dieser Antikörper richtet sich direkt gegen das nukleäres Ki67-Antigen, welches in allen Phasen des Zellzyklus mit Ausnahme der frühen G1-Phase und G0-Phase exprimiert wird und daher eng mit der Proliferation von Zellen assoziiert ist (Gerdes et al. 1983).

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchungsmaterial

Es wurden von 180 Patienten, die zwischen 1994 und 1996 in der chirurgischen Universitätsklinik Rostock an einem primären kolorektalen Karzinom operiert wurden, die archivierten Resektate histopathologisch untersucht. Die Präparate sind in der Pathologie der Universität Rostock archiviert, primär in Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet worden.

Von den 180 Fällen mussten sieben Fälle ausgeschlossen werden. Drei der Fälle fielen aus der Studie, da die Paraffin-Blöcke mit den kolorektalen Karzinomen für die primären pathohistologischen Untersuchungen aufgebraucht waren. Vier Fälle konnten wegen zu starker granulozytärer Infiltration nicht ausgewertet werden.

Die primären histopathologischen Befunde, welche zu über 90% von einem Pathologen nach standardisierten Kriterien erhoben bzw. kontrolliert worden sind, lieferten die Informationen über Geschlecht, Alter, TNM, Grading, histologischen Typ und Residualstatus zum Zeitpunkt der Operation. Die pathohistologische Einteilung in pTNM-, R-, G- und Stadien-Klassifikation erfolgte nach den UICC Committee-Richtlinien von 1987.

Alle Fälle sind unabhängig vom TNM-Stadium, Differenzierungsgrad, Alter, Geschlecht und Art der Therapie in die vorliegende Studie aufgenommen worden.

Von den 173 kolorektalen Karzinomen waren 86 von weiblichen und 87 von männlichen Patienten. Das Alter variierte zwischen 29 und 90 Jahren (Mittelwert 64,9 Jahre; Median 66 Jahre). Wir untersuchten 7 Tumoren im pT 1-Stadium, 22 im pT 2, 100 im pT 3 und 44 Tumoren im pT 4-Stadium. Das Grading teilte sich auf in 28 G1-, 123 G2- und 22 G3- Fälle. 20 Tumoren (11,6%) entstammten dem Zökum, 27 dem Kolon ascendens (15,6%) und der rechten Flexur, 10 dem Kolon transversum (5,8%), 14 der linken Flexur und dem Kolon descendens (8,1%), 38 dem Sigma (22,0%) und 64 Tumoren (37,0%) waren im Rektum lokalisiert.

Zum Zeitpunkt der Operation hatten bereits 95 Patienten von 173 Fällen Lymphknotenmetastasen und bei 28 Patienten konnten Fernmetastasen nachgewiesen werden. In 12 Fällen konnte der Tumor durch die primäre Operation nicht vollständig reseziert werden.

Tab.1: Klinische und histopathologische Parameter der untersuchten kolorektalen Karzinome nach Anzahl und prozentualen Anteil

	n	in %
GESCHLECHT		
männlich	86	49,7
weiblich	87	50,3
ALTER		
< 65 Jahre	86	49,7
> 65 Jahre	87	50,3
TUMORLOKALISATION		
Zökum	20	11,6
Kolon ascendens, rechte Flexur	27	15,6
Kolon transversum	10	5,7
Linke Flexur, Kolon descendens	14	8,1
Sigma	38	22,0
Rektum	64	39,3
pT-STADIUM		
T1	7	4,1
T2	22	12,7
T3	100	57,8
T4	44	25,4
LYMPHKNOTENSTATUS		
N0	78	45,1
N1	52	30,1
N2	43	24,8
FERNMETASTASEN		
M0	145	83,8
M1	28	16,2

DIFFERENZIERUNGSGRAD		
G1	28	16,2
G2	123	71,1
G3	22	12,7
RESIDUALTUMOR		
R0	161	93,1
R1	12	6,9
TUMORSTADIUM NACH TNM		
I	23	13,3
II	55	31,8
III	66	38,2
IV	29	16,8

Die klinischen Daten zum Verlauf wurden retrospektiv durch Einsicht, der in der chirurgischen Universitätsklinik Rostock archivierten klinischen Akten, ermittelt bzw. vom Hausarzt erfragt.

139 Patienten hatten zum Zeitpunkt der Operation keine Fernmetastasen und keine regionalen Tumorreste und wurden als potentiell kurativ operiert ermittelt. Die Operation erfolgte abhängig von der Tumorlokalisation nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie. In allen Fällen mit kurativer Intention konnten die regionalen Lymphknoten mit entfernt werden.

Eine adjuvante Chemotherapie wurde bei 29 Patienten, eine alleinige adjuvante Radiotherapie in einem Fall und eine nachfolgende Chemo- und Radiotherapie bei 22 Patienten mit kolorektalem Karzinom durchgeführt. Patienten, bei denen zur praeoperativen Tumorverkleinerung eine neoadjuvante Chemo- oder Radiotherapie erfolgte, gingen nicht in die Studie mit ein.

Mit Hilfe der gesammelten klinischen Daten konnten die Patienten über einen mittleren Zeitraum von ca. 50 Monaten, maximal 94 Monate retrospektiv beobachtet werden.

Für die Überlebensanalyse wurden zwei Ereignisse als Endpunkt definiert, einerseits der

eingetretene Tod durch das kolorektale Karzinom (Tod durch die Krankheit) und andererseits die Erstmanifestation von Fernmetastasen.

Der Beobachtungszeitraum begann mit dem Tag der Operation und endete

1. mit dem Tod des Patienten durch die Krankheit oder
2. mit dem Auftreten von Fernmetastasen oder
3. mit dem Tod des Patienten durch Krankheiten, die mit dem Tumorleiden nicht im kausalem Zusammenhang standen (zensierte Beobachtung) oder
4. mit dem Überleben bis zum Ende der Beobachtungszeit (zensierte Beobachtung).

Wie oben erwähnt, wurden die Punkte 1 und 2 als Ereignis definiert und die Punkte 3 und 4 zensiert. Zur Vermeidung einer Datenverfälschung durch die postoperative Klinikletalität wurden Patienten, die innerhalb von 30 Tagen nach der Operation verstarben, nicht in die Studie mit aufgenommen.

Aus den Jahren 1994 bis 2001 konnten 55 in der chirurgischen Universität Rostock resezierte und archivierte synchrone oder metachrone Lebermetastasen von kolorektalen Karzinomen untersucht werden (37 Hemihepatektomien, 18 Segmentresektionen).

6 Lebermetastasen konnten synchron, d.h. gleichzeitig mit dem Primärtumor bzw. in einer Zweitoperation im unmittelbaren Anschluss an die Primärtumorsektion und 49 metachron, d.h. zu unterschiedlichen Zeitpunkten diagnostiziert und operiert werden.

Klinische Daten zur Operation und zum Verlauf zeigten sich in den archivierten Patientenakten. Informationen über Anzahl und Größe der Lebermetastasen konnten durch die primären histopathologischen Befunde gewonnen werden.

Für einen Vergleich der Proliferationsrate zwischen normaler Mucosa und dem Tumorgewebe diente die Untersuchung von 10 Fälle tumorfreier Mucosa und 20 Tumoren. Die Stichprobenauswahl der Präparate stammte aus den 173 Gesamtfällen.

Darüber hinaus wurde die Proliferationsaktivität von 10 Tumoren mit einem geordneten Kapillarwachstumsmuster gegenüber 10 Tumoren mit stark ungeordnetem Wachstumsmuster der Kapillaren verglichen.

2.2. Immunhistochemische Untersuchungen

Zur Darstellung der Tumorgefäße wurden für jeden Fall ein bis zwei repräsentative Paraffinblöcke ausgesucht. Alle Blöcke der kolorektalen Karzinome enthielten den Bereich der tiefsten Infiltrationsfront. In dem größten Teil der Fälle schloss der Block auch den

oberflächlichen Anteil des Karzinoms mit ein. Die Paraffinblöcke der Lebermetastasen enthielten den Bereich der Infiltrationsfront und das Zentrum der Metastasen.

Von den repräsentativen Blöcken sind 4 µm dicke Schnittpräparate angefertigt, die Paraffinschnitte auf einem Objektträger aufgetragen und mit Xylol entparaffinisiert worden.

In der vorliegenden Studie wurden die Kapillaren im Primärtumor und in den Lebermetastasen mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers gegen den auf der Oberfläche von Endothelzellen befindlichen Faktor VIII - von Willebrand (DAKO, Cytomation, Dänemark) in einer Verdünnung von 1/1000 markiert. Zur Darstellung und Signalverstärkung diente, entsprechend der Empfehlung des Herstellers, ein APAAP-Verfahren (Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase). Bei dieser Methode tritt eine rötliche bis kräftig fuchsinrote Färbung der Endothelzellen auf.

Zur Darstellung des Tumors und zur Abgrenzung zwischen Tumor- und Normalgewebe diente die Routinefärbung mit Hämatoxylin und Eosin.

Stark zerrissene, überfärbte oder mangelhaft gefärbte Paraffinschnitte konnten nicht beurteilt werden. In ca. 20% der Fälle musste eine Nachfärbung vorgenommen werden, da eine hohe Qualität der Färbung Voraussetzung für die quantitative Auswertung war.

Die Endothelzellproliferation konnte unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers gegen das Ki67-Antigen beurteilt werden.

Für den Nachweis des Proliferationsfaktor Ki67 diente der monoklonale Antikörper MIB 1 (DAKO, Specification Sheet, Code M 7240, Dänemark) in einer Konzentration von 1:200 an den 4 µm Paraffinschnitten.

Zusätzlich wurden die Endothelien mit dem monoklonalen Antikörper gegen F VIII markiert. Zur Visualisierung und Signalverstärkung der spezifischen Protein-Antikörperreaktion konnte bei der Ki67-Färbung die APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase) ebenfalls genutzt werden. Bei diesem Verfahren trat eine braune bis schwärzliche Färbung der proliferierenden Epithelzellkerne bei rötlicher Auskleidung der Endothelwände auf.

Die Arbeitsschritte der Faktor VIII - Reaktion sowie der Ki67 / F VIII-Doppelmarkierung können im Anhang nachgelesen werden.

2.3. Qualitative und quantitative Auswertung

Die quantitative und qualitative Auswertung der Tumervaskularisation sowie der Einschätzung der Proliferation erfolgte unter Verwendung eines Zeiss Axioplan Lichtmikroskopes. Zur erleichterten Orientierung diente ein Rasterokular mit 121 Gitterkreuzen, bestehend aus 11 horizontalen und 11 vertikalen Rasterlinien.

Die Auszählung der Kapillaren erfolgte an den Orten der höchsten Kapillardichte, den sogenannten „hot spots“. Dieses Verfahren folgte im wesentlichen den Richtlinien von Weidner (Weidner et al. 1991).

Für die Gesichtsfeldauswahl wurden dazu folgende Standards festgelegt:

1. Die Auszählung der Kapillaren erfolgte an den Orten der höchsten Kapillardichte, den sogenannten „hot spots“.
2. Kapillaren im Bereich der Tunica muscularis oder direkt am Rand der Tunica muscularis fanden keine Beachtung, da es sich hier um präexistierende Kapillaren handelte.
3. „Hot spots“ im Bereich der Infiltrationsfront wurden bevorzugt als Auszählungsort gewählt. Daraus folgte, dass die Kapillaren der pT3- und pT4-Tumoren im perikolischen oder perirektalen Fettgewebe und die der pT1- und pT2-Tumoren in der Submucosa ausgezählt wurden.
4. Bei einer geringeren Vergrößerung wurden die Gebiete mit der höchsten Kapillardichte aufgesucht.
5. Die Auszählung der Kapillaren erfolgte bei einer 200fachen Vergrößerung.
6. Es sind alle Gefäßanschnitte auf der Fläche des gesamten Gesichtsfeldes ($0,74 \text{ mm}^2$) ausgezählt worden. Aus drei bis vier Zählungen ging der höchste Wert in die Studie ein.
7. Innerhalb eines „hot spot“ wurden die Präparate zur Vermeidung von Doppelzählungen von links oben nach rechts unten mäanderförmig durchgemustert.
8. Zur Vermeidung von subjektiven Untersuchungseinflüssen ist vor jeder neuen Gesichtsfeldeinstellung defokussiert worden.
9. Gebiete mit einer stark leukozytären oder hämorrhagischen Infiltration sowie Gebiete in der Nähe von ulzerösen Veränderungen und großflächigen Nekrosen wurden für die Kapillarzählung nicht benutzt.

Die folgende Abbildung zeigt beispielhaft einen „hot spot“, das Areal im kolorektalen Karzinom mit einer deutlich erhöhten Kapillardichte.

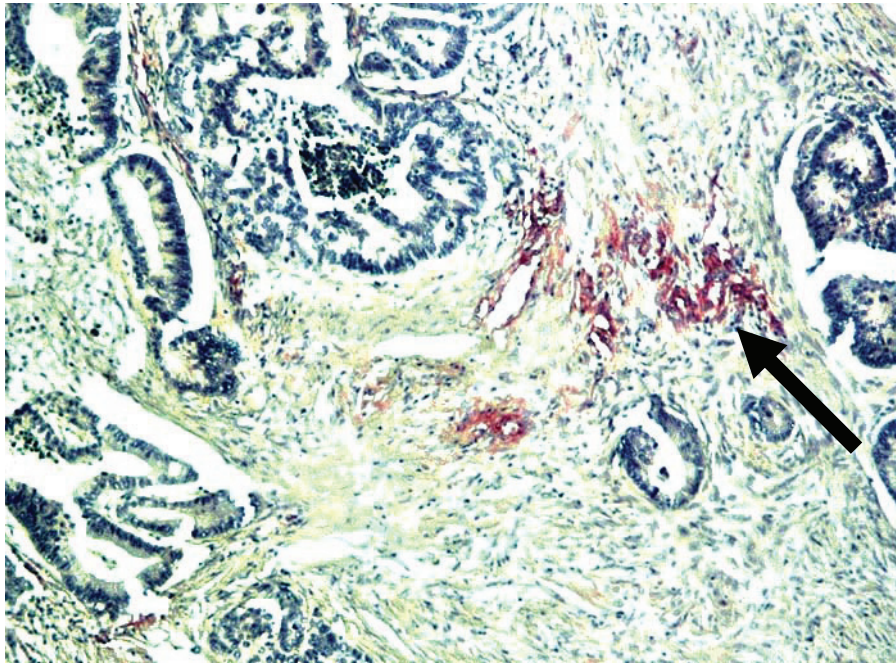


Abb.1: Fokale Häufung von Blutgefäßen im Tumorstroma – sogenannter „hot spot“ (F VIII -Immunhistologie)

Nur ein Untersucher wertete die Präparate ohne Kenntnis der klinischen und pathologischen Daten aus.

In den Lebermetastasen erfolgte nach demselben Verfahren die Auszählung der Kapillaren in den „hot spots“ im Bereich der Infiltrationsfront und im Tumorzentrum. Als Infiltrationsfront wurde dabei eine 2-3 mm breite Zone an der äußeren Grenze des Tumors definiert. In zwei Fällen war das Tumorzentrum in den Schnitten nicht enthalten.

Für den Vergleich der Kapillardichte zwischen Primärtumor und Lebermetastasen ging der höchste Wert in die Auswertung ein.

In dieser Studie diente zur quantitativen Erfassung der Tumorgefäße die Anzahl der Kapillaren in den „hot spots“.

Für diese Gefäßparameter galten folgende Standards:

1. Ein Zahlenwert entsprach der Anzahl von Kapillaren, die in einem kompletten Gesichtsfeld ($0,74 \text{ mm}^2$) bei einer 200fachen Vergrößerung zu finden waren.
2. Der größte Wert der drei bis vier Zählungen ging in die Auswertung ein.
3. Kapillaren mit einer Muskelwand oder einem großen Lumen wurden nicht gezählt.
4. Ein zusammenhängend angefärbtes Kapillarkonglomerat oder einzelne angefärbte Kapillaren gingen als eine Kapillare in die Beurteilung ein.

Neben den numerischen Quantitäten der Kapillardichte konnte für die statistische Auswertung ein semiquantitativer Score mit dem Median als Grenze gebildet werden. Hiernach teilte sich die Gesamtgruppe in die niedrig kapillarisierten kolorektalen Karzinome, welche eine absolute Kapillaranzahl unter oder gleich dem Median hatten und in die Gruppe der hoch kapillarisierten kolorektalen Karzinome mit einer Kapillaranzahl über dem Median.

Darüber hinaus fand auch ein qualitativer Gefäßparameter, die Kapillararchitektur, in der vorliegenden Studie Beachtung. Zur Einschätzung der Kapillararchitektur wurde das Ausbreitungsmuster der Kapillaren in die Gruppen langgestreckt/verzweigt ($> 75\%$), kurz/fragmentiert ($> 75\%$) oder beide Gruppen gemischt, zwischen jeweils 25–75%, eingestuft. Außerdem erfolgte eine Einschätzung der Kapillarausbreitung in Bezug zum Tumor in Form des Grades der Tumorumhüllung. Die kapilläre Tumorumhüllung gliederte sich in den Tumor überwiegend ($> 75\%$), teilweise (25–75%) und kaum oder gar nicht ($< 25\%$) umhüllend.

Aus diesen Parametern konnten fünf Bildmuster entworfen werden.

Das eine Ende des Spektrums zeigt die Abbildung 2. Kennzeichnend sind hier überwiegend länglich verzweigte Kapillaren, die die Tumornester unmittelbar umhüllen.

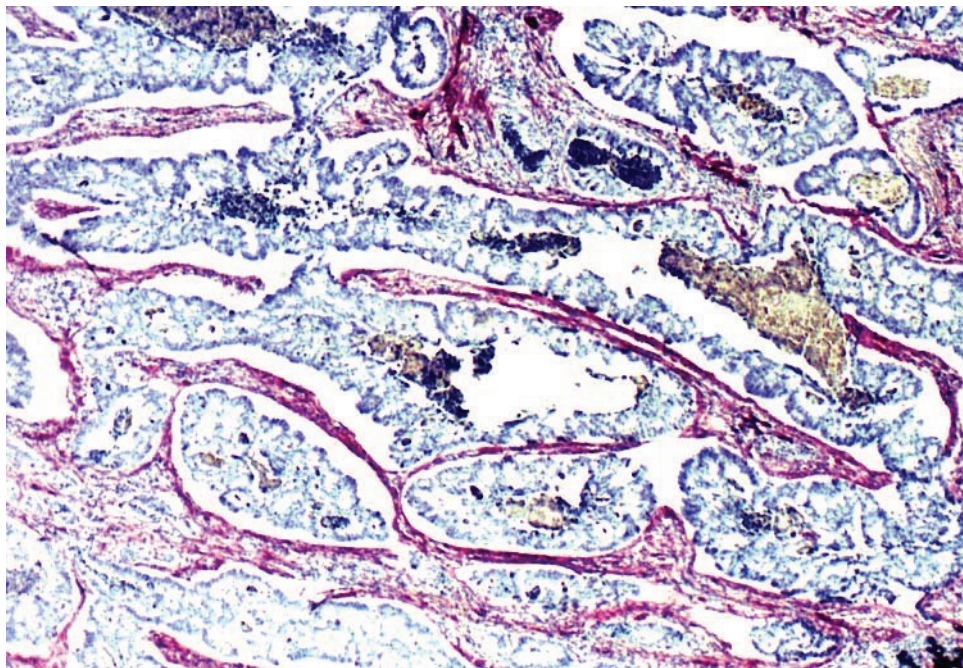


Abb.2: Kolorektales Karzinom mit einem geordneten Kapillarmuster

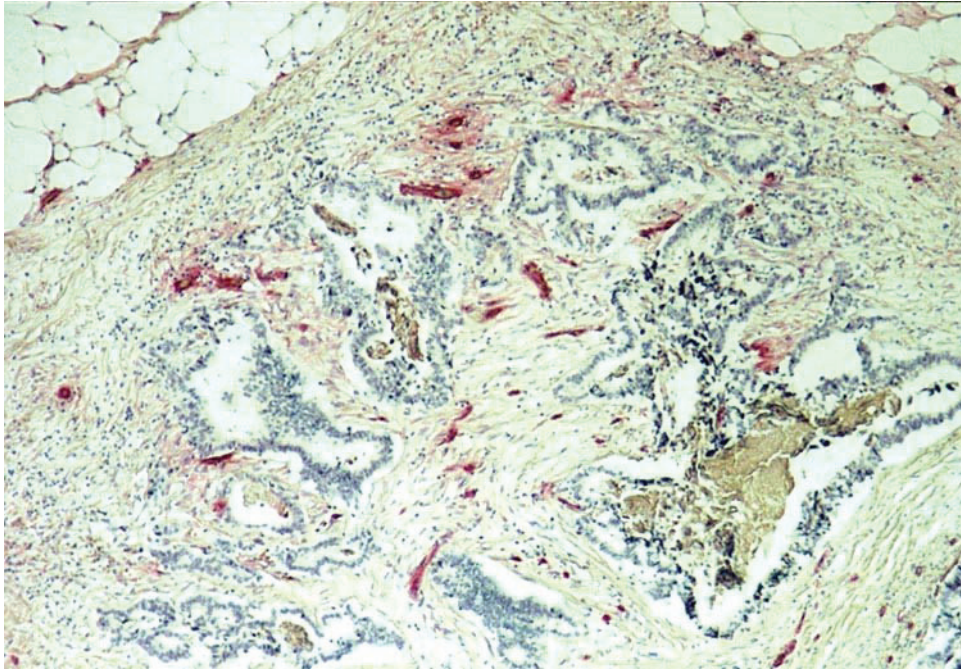


Abb.3: Kolorektales Karzinom mit einem ungeordneten Kapillarmuster

Das andere Ende des Spektrums ist in Abbildung 3 erkennbar. Hier findet sich überwiegend eine zwischen den Tumornestern liegende, diffuse, unstrukturierte, kurz fragmentierte Kapillararchitektur. Die drei anderen Muster stellen Zwischenstufen dar.

Mit Hilfe dieser fünf Bildmuster konnte jeder Fall nach seiner überwiegend vorherrschenden Kapillararchitektur in drei Architekturscores (Formscore 1 bis 3) gut reproduzierbar eingeteilt werden. Der Formscore 1 verschlüsselt dabei die Tumoren mit einer geordneten Kapillararchitektur und der Formscore 3 die Tumoren mit einer ungeordneten. Tumoren mit geordneten und ungeordneten Kapillarmusterqualitäten zu ungefähr gleichen Anteilen wurden dem Formscore 2 zugewiesen. In den Lebermetastasen wird die Kapillararchitektur separat im Metastasenzentrum und am Metastasenrand beurteilt. Für den Vergleich der Kapillararchitektur im Primärtumor mit der in den Lebermetastasen ging der überwiegend im Metastasenschnittpräparat vorkommende Formscore in die Wertung ein.

Zur Beurteilung der Endothelproliferation ist der Anteil der markierten Endothelzellkerne von jeweils 500 Endothelzellkernen bei 400facher Vergrößerung ausgezählt worden. Die Zählung erfolgte im Tumor und für den Vergleich in der normalen Mucosa. Das Präparat wurde dabei systematisch mäanderförmig durchgemustert. Die Zählung endete nach insgesamt 500

ausgezählten Endothelzellkernen. Einige Schnitte enthielten keine 500 Endothelzellkerne. Hier wurden alle möglichen Endothelzellkerne im Schnitt ausgezählt und der Anteil der proliferierenden Zellkerne prozentual aufgenommen. Es waren in keinem Fall weniger als 400 Endothelzellkerne. Der prozentuale Anteil der proliferierenden Endothelzellen kam in der Studie zur Auswertung. Die Ki67 Proliferationsrate (= Ki67-Index(%)) berechnete sich folgendermaßen:

$$\text{Ki67-Index(\%)} = \frac{\text{Ki67 positive Endothelzellen}}{\text{Ki67 positive + negative Endothelzellen}} \times 100$$

Für den Vergleich der Proliferation zwischen Karzinom und gesunder Mucosa wurde der Ki67-Index(%) von insgesamt 20 Tumorpräparaten mit dem Ki67-Index(%) gesunder Dickdarmmucosa beurteilt.

Um Unterschiede der Endothelproliferation in Abhängigkeit von der Kapillararchitektur zu prüfen, diente der Vergleich der Ki67-Indizes(%) von 10 Tumoren mit einer geordneten Kapillararchitektur (Formscore 1) gegenüber 10 Tumoren mit einer ungeordneten Kapillararchitektur (Formscore 3).

2.4. Statistik

Alle statistischen Tests konnten mit dem SPSS-Programm Version 10.0 (Statistik-Programmsystem für die Sozialwissenschaften) am Computer errechnet werden. Histopathologische und klinische Daten wurden als Variable in die Tabelle eingetragen und auf eine Normalverteilung überprüft.

Die Korrelation zwischen zwei Variablen ist mit Hilfe des Kendalls-Tau-Koeffizienten bestimmt worden.

Für die Berechnung der Signifikanz der Unterschiede zwischen zwei Variablen bei den Mittelwerten nutzten wir für die mehrfaktorielle Analysen den ANOVA-Test und für die einfaktoriellen Analysen den t-Test.

Der Vergleich zwischen den einzelnen Variablengruppen konnte mit den Post-Hoc-Analysen durchgeführt werden. Der Bonferoni-Test prüfte auf Signifikanz.

Die Überlebensanalyse erfolgte mit Hilfe der Kaplan-Meyer-Kurven und deren Signifikanz wurde mit dem Log-Rang-Test überprüft. Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen ist bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ angenommen worden.

3. Ergebnisse

3.1. Gefäßdarstellung mit dem Antikörper gegen Faktor VIII

Durch die immunhistochemische Markierung der Kapillaren mit dem monoklonalen Antikörper gegen Faktor VIII gelang bei dem überwiegenden Anteil der Präparate eine gleichmäßige und deutliche Anfärbung der Endothelien von Kapillaren und den großen Blutgefäßen im Tumorgewebe und in der normaler Mucosa. Ca. 20% der Präparate wiesen bei der ersten Markierung eine nur schwache, teilweise unregelmäßige Färbung oder eine starke Überfärbung auf, so dass die Reaktion wiederholt werden musste. Auch Thrombozyten zeigten eine Farbreaktion. Das machte eine Abgrenzung zu Endothelien bei einer 200fachen Vergrößerung in einzelnen Fällen schwierig. Allerdings konnte bei einer stärkeren Vergrößerung eine Unterscheidung aufgrund der typischen Morphologie getroffen werden. Lymphgefäße färbten sich nicht.

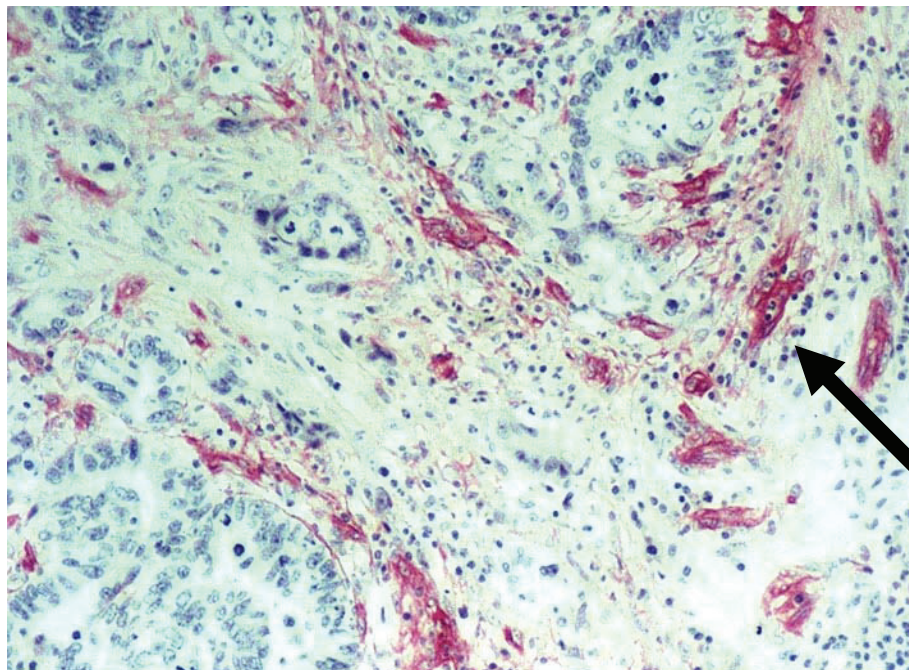


Abb.4: Gefäßdarstellung mit dem Antikörper gegen Faktor VIII (rAG) bei einer 200fachen Vergrößerung

Eine teilweise sehr schwach bis mäßig auftretende Hintergrundfärbung schränkte die Kapillarauswertung nicht ein. Die Abbildung 4 lässt deutlich die durch die Faktor VIII markierten, rot gefärbten Kapillaren zwischen dem Tumorverlauf bei einer 200fachen Vergrößerung erkennen.

Auffällig war eine durchgehend sehr geordnete Struktur der Kapillaren in der normalen

Mucosa und eine das gesamte Spektrum enthaltende Kapillararchitektur im Tumorgewebe von sehr geordnet bis sehr ungeordnet.

3.2. Doppelmarkierung mit dem Proliferationsmarker Ki67 und Faktor VIII

Proliferierende Zellen konnten mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers gegen Ki67 durch die deutlich hell- bis dunkelbraune Kernfärbung von den nicht proliferierenden Zellen unterschieden werden.

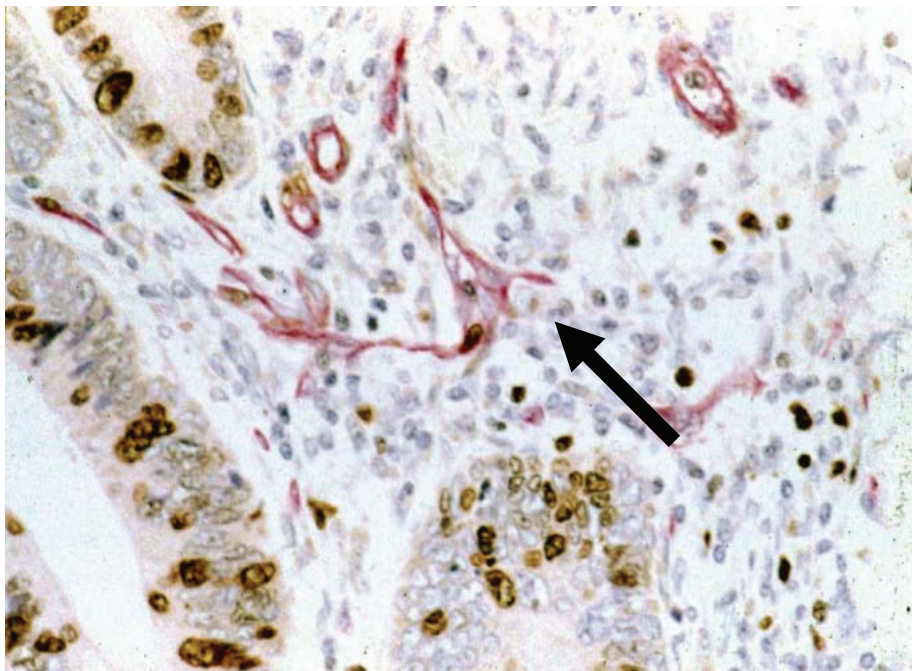


Abb.5: Darstellung der Endothelzellproliferation durch eine Doppelmarkierung mit dem Antikörper Ki67 und Faktor VIII bei einer 400fachen Vergrößerung

Eine Identifizierung der Endothelzellen fiel durch die Doppelmarkierung mit dem Antikörper gegen Faktor VIII leicht. Die proliferierenden Endothelzellen innerhalb der gefärbten Kapillarstränge konnten, wie die Abbildung 5 zeigt, eindeutig bei einer 400fachen Vergrößerung von den proliferierenden Tumorzellen unterschieden werden.

Auch die Unterscheidung zwischen markierten Granulozyten und Lymphozyten war aufgrund der intraluminalen Lokalisation und der typischen Morphologie der Entzündungszellen und Endothelzellen gut möglich. Die markierten Ki67 positiven Endothelzellkerne verteilten sich unstrukturiert entlang der Gefäßstränge im Tumor und in der normalen Mucosa.

3.3. Kapillardichte im kolorektalen Karzinom

Die Kapillarverteilung in den meisten der 173 kolorektalen Schnittpräparate wiesen einen hohen Grad an Heterogenität mit Orten höherer und niedriger Kapillardichte auf.

In den „hot spots“ der kolorektalen Karzinome fanden sich in der Gesamtgruppe der 173 Fälle, minimal 8 und maximal 140 Gefäßanschnitte ($0,74 \text{ mm}^2$). Der Mittelwert lag bei 51,8 ($\text{SD} \pm 24,04$), der Median bei 48.

Tab.2: Kapillardichte der kolorektalen Karzinome in der Gesamtgruppe

	n	Mittelwert	Standard- abweichung	Median	Min.	Max.
Gesamtgruppe	173	51,80	$\pm 24,04$	48,00	8	140

3.3.1. Kapillardichte der kolorektalen Karzinome in Abhängigkeit von klinischen und histopathologischen Daten

Gliederte man die Tumoren in der Gesamtgruppe nach der Infiltrationstiefe pT (nach UICC), war ein nicht signifikanter aber tendenzieller Abfall der Kapillardichte in den „hot spots“ bei zunehmender Infiltrationstiefe erkennbar ($p < 0,100$; einfaktoriell ANOVA). Dabei fand sich bei den in die Submucosa infiltrierenden pT1-Tumoren eine mittlere Kapillardichte von 62 Kapillaren pro Gesichtsfeld bei einer 200fachen Vergrößerung.

Die Kapillardichte fiel mit zunehmender Infiltrationstiefe ab, so dass in den bis in die Tunica muscularis infiltrierenden kolorektalen Karzinome (pT2) 59,91 ($\pm 23,68$) Kapillaren im Mittel pro Gesichtsfeld auszuzählen waren.

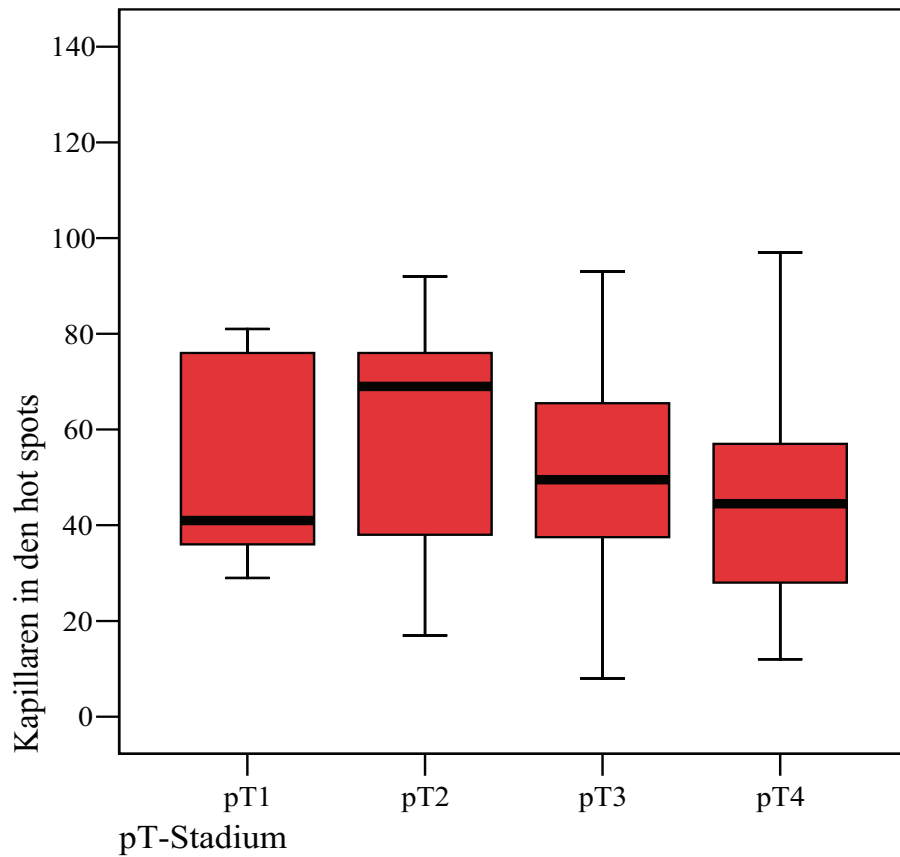


Abb.6: Box plots der Kapillaranzahl gruppiert nach den pT-Stadien

Bei den Tumoren, die über die Tunica muscularis hinaus infiltrierten, ließen sich im Mittel 51,83 (SD \pm 22,79) in der Gruppe der pT3 und 46,11 (SD \pm 23,22) Kapillaren pro Gesichtsfeld in der Gruppe der pT4-Tumoren auszählen. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren statistisch nicht signifikant ($p = 0,100$; einfaktoriell ANOVA).

Bildete man 2 Gruppen, einerseits bestehend aus Tumoren, welche bis in die Lamina muscularis propria infiltrierten (pT1 und pT2) und andererseits aus Tumoren, die extramural infiltrierten (pT3 und pT4), so ließ sich ein signifikanter Unterschied in den Mittelwerten der Kapillaranzahl zwischen diesen beiden Gruppen feststellen, ($p = 0,034$; t-Test für unabhängige Stichproben). Dabei hatte die Gruppe bestehend aus pT1- und pT2-Tumoren mit einer mittleren Kapillardichte in den „hot spots“ von 60,41 ($SD \pm 27,54$) eine signifikant höhere Kapillardichte als die Gruppe der pT3- und pT4-Tumoren mit einem Mittelwert von 50,8 ($SD \pm 22,99$). Die Abbildung 6b stellt im Vergleich der kolorektalen Karzinome, welche bis maximal in die Lamina muscularis propria (pT1 und pT2) und denen die darüber hinaus infiltrieren (pT3 und pT4), den signifikanten Abfall der Kapillardichte dar.

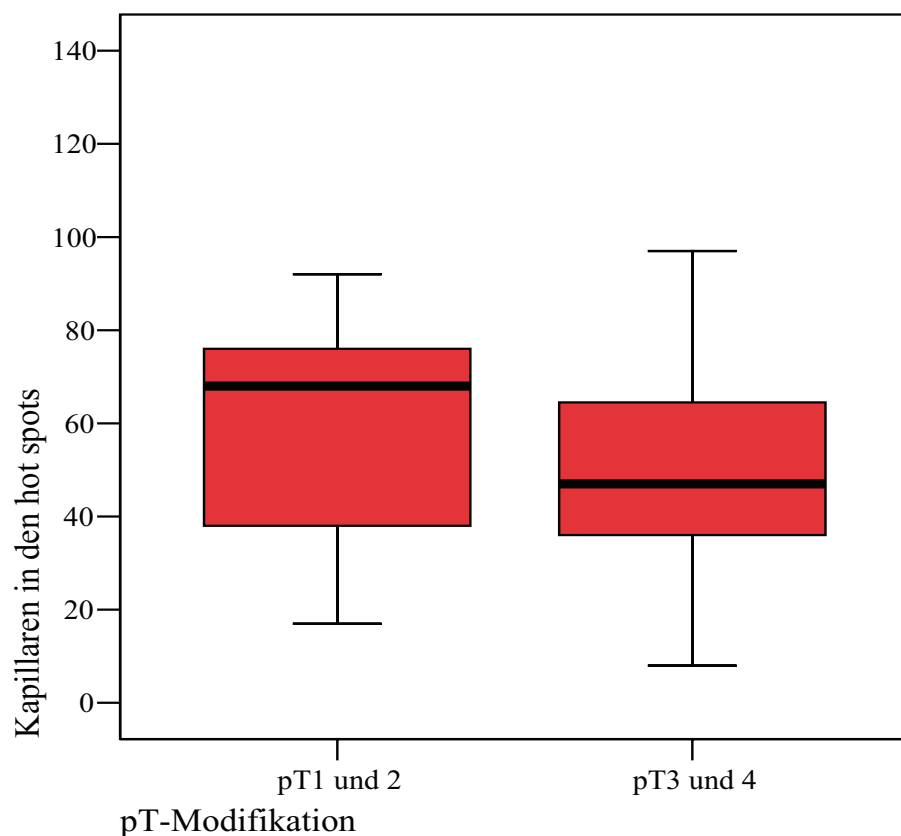


Abb.6b: Box plots der Kapillaranzahl für pT1- und pT2-Tumoren gegenüber pT3- und pT4-Tumoren

Deutliche Unterschiede zeigten sich beim Vergleich der kolorektalen Karzinome mit und ohne Lymphknotenmetastasen zum Zeitpunkt der Operation. Die mittlere Kapillardichte bei nodal positiven Tumoren betrug 44,21 (SD \pm 16,12) Kapillaren pro Gesichtsfeld in den „hot spots“ bei den pN1- und 47,93 (SD \pm 23,79) bei den pN2-Tumoren. Deutlich höher dagegen war die mittlere Kapillardichte mit 59,08 (SD \pm 26,69) Kapillaren bei den pN0-Tumoren ($p < 0,001$; einfaktoriell ANOVA).

Die Abbildung 7 stellt in Form von Box plots die Unterschiede zwischen den einzelnen pN-Stadien graphisch dar. Hier sind die signifikanten Unterschiede der Kapillardichte zwischen pN0- und pN1- ($p = 0,001$) und zwischen pN0- und pN2-Tumoren ($p = 0,039$) verdeutlicht. Wohingegen es keinen signifikanten Unterschied zwischen pN1- und pN2-Tumoren gab.

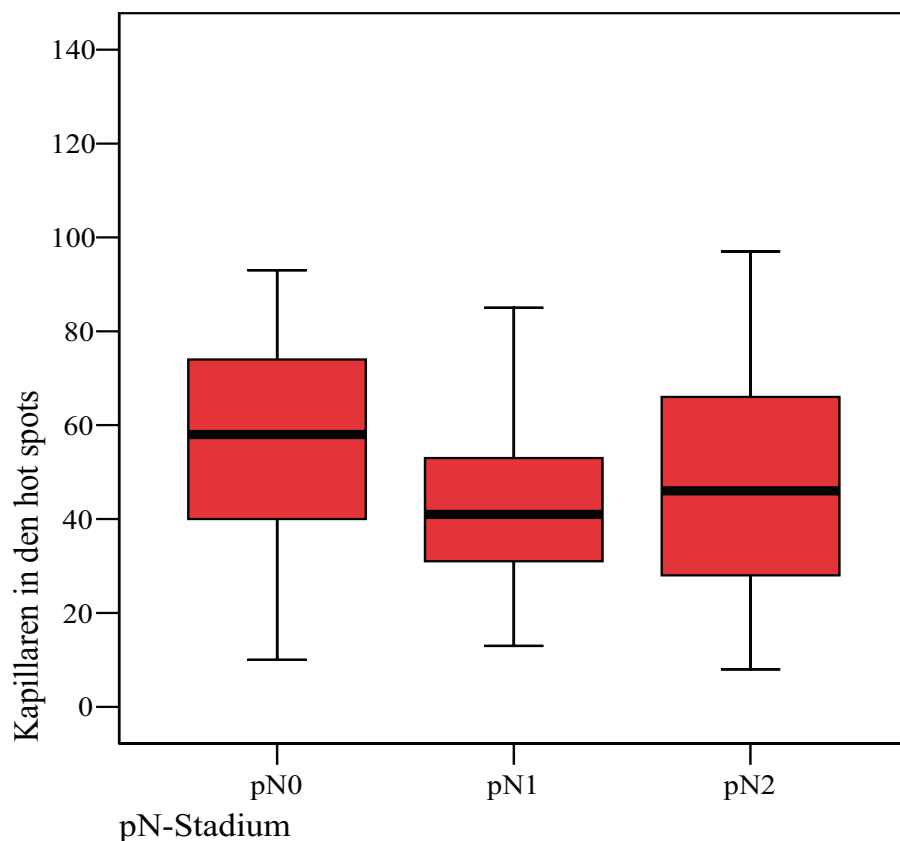


Abb.7: Box plots der Kapillaranzahl gruppiert nach den pN-Stadien

Die Werte für die Kapillaranzahl bei Tumoren mit synchronen Fernmetastasen (M1) und ohne Fernmetastasen (M0) werden in Abbildung 8 dargestellt. Die Unterschiede waren mit durchschnittlich 52,25 (SD \pm 23,77) Kapillaren in den Karzinomen ohne Fernmetastasen gegenüber 48,96 (SD \pm 26,13) bei den synchron metastasierten Karzinome nur geringfügig. Es ergaben sich keine signifikanten Differenzen in ihrer Kapillardichte ($p = 0,542$; t-Test für unabhängige Stichproben).

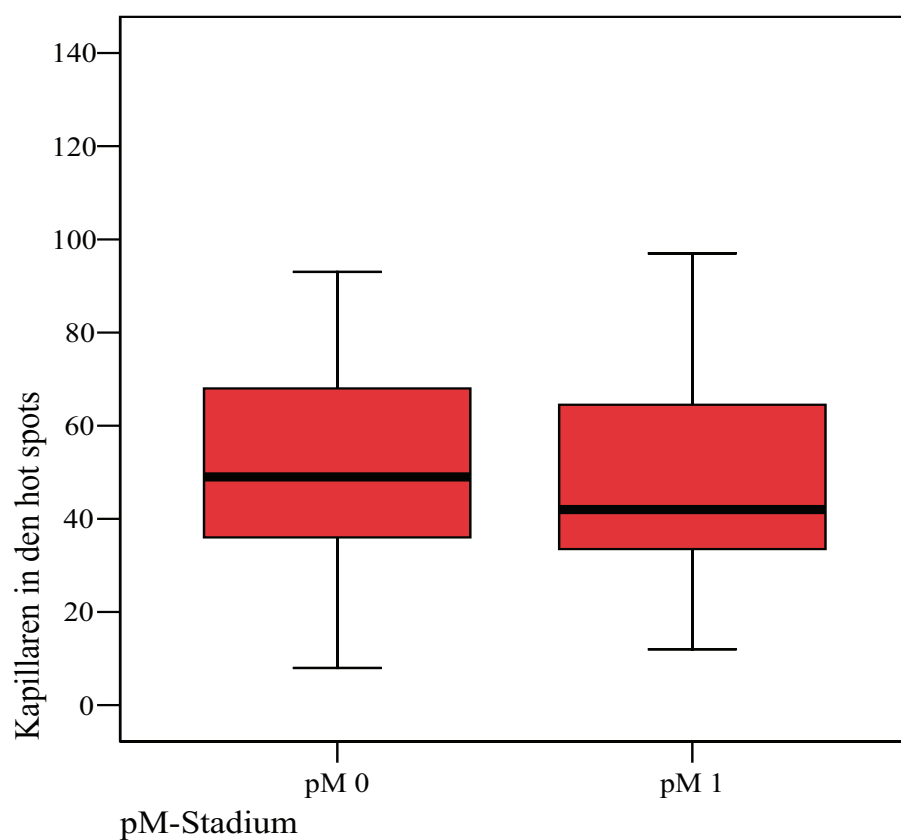


Abb.8: Box plots der Kapillaranzahl gruppiert nach den pM-Stadien

Die Kapillaranzahl in den kolorektalen Karzinomen, aufgeteilt nach ihrem Differenzierungsgrad, ließen keine signifikanten Unterschiede erkennen. Die gering werdende Kapillardichte von 55,37 ($SD \pm 21,24$) in den Karzinomen mit dem Differenzierungsgrad 1 über 51,8 ($SD \pm 22,97$) Kapillaren bei Karzinomen mit dem Differenzierungsgrad 2 auf 46,86 ($SD \pm 32,86$) Kapillaren der G3-Tumoren war nicht signifikant. Den Vergleich der Kapillaranzahl zwischen den kolorektalen Karzinomen eingestuft in die drei Differenzierungsgrade zeigt die Abbildung 9. Die Unterschiede waren auf einem Niveau von $p < 0,464$ nicht signifikant (einfaktoriell ANOVA).

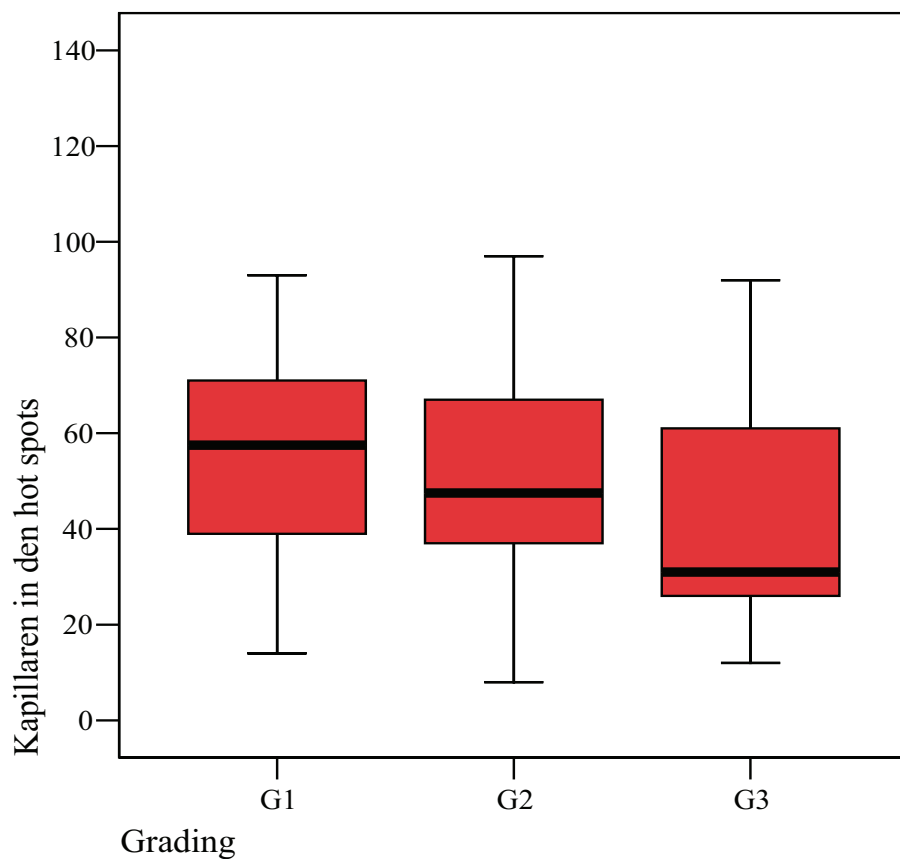


Abb.9: Box plots der Kapillaranzahl gruppiert nach den Differenzierungsgraden

Konnten die Primärtumoren nicht vollständig durch die Operation reseziert werden, fanden sich in diesen eine signifikant niedrigere Kapillardichte als in den vollständig exstirpierten Primärtumoren ($p = 0,007$; t-Test für unabhängige Stichproben). Den Vergleich der Kapillardichte zwischen vollständig und den unvollständig resezierten kolorektalen Karzinomen zeigt graphisch die Abbildung 10. Der größte Anteil ($n = 161$) von den 173 ausgewerteten kolorektalen Karzinomen konnte vollständig reseziert werden. Diese Tumoren zeigten mit $53,14$ ($SD \pm 23,98$) Kapillaren im Mittel gegenüber $34,00$ ($SD \pm 17,22$) Kapillaren bei den unvollständig resezierten kolorektalen Karzinomen eine deutlich ausgeprägtere Kapillarisierung.

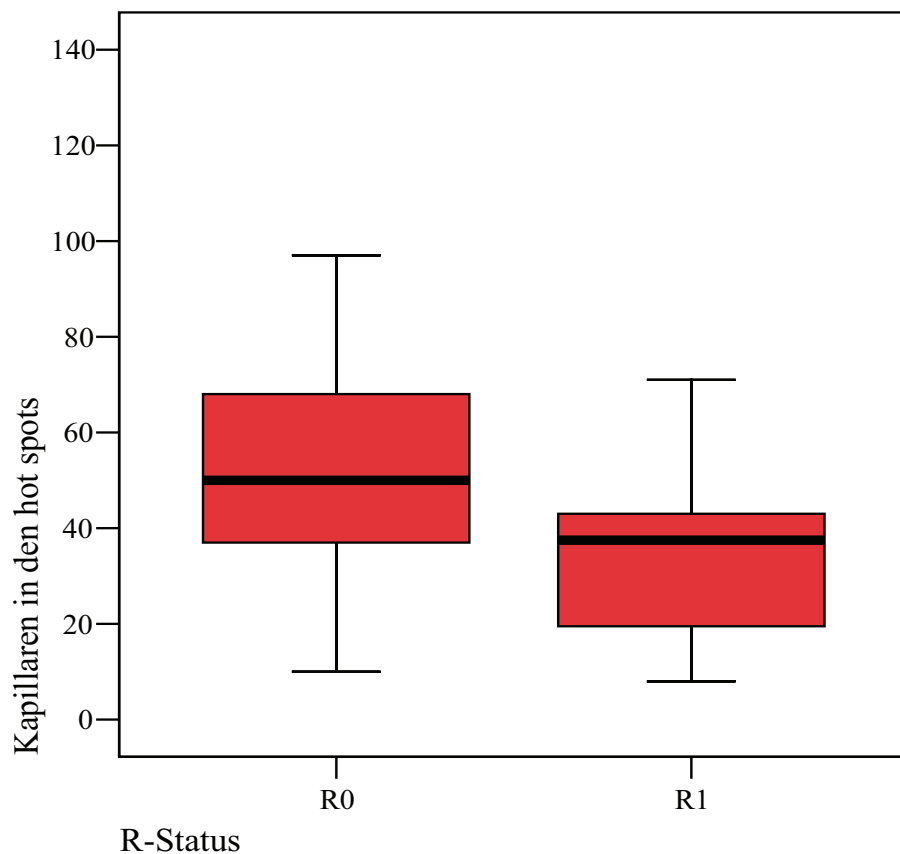


Abb.10: Box plots der Kapillaranzahl gruppiert nach dem Residualstatus

3.4. Kapillardichte als prognostischer Faktor

Über einen mittleren Zeitraum von 50 Monaten (min. 2, max. 94 Monate) konnte der klinische Verlauf der Patienten nach der Primäroperation beobachtet werden. Nach Beendigung der Beobachtungszeit waren 59 Patienten (34,1%) aufgrund der kolorektalen Karzinomerkrankung verstorben.

In der Gesamtgruppe (n = 173) zeigte sich bei der univariaten Kaplan-Meier Analyse mit dem Median der Kapillardichte als Trennwert ein signifikanter Einfluss der Kapillardichte auf die Überlebenszeit ($p = 0,024$; log rank-Test). Eine hohe Kapillardichte in den „hot spots“ kolorektaler Karzinome korrelierte dabei mit einem längeren Überleben.

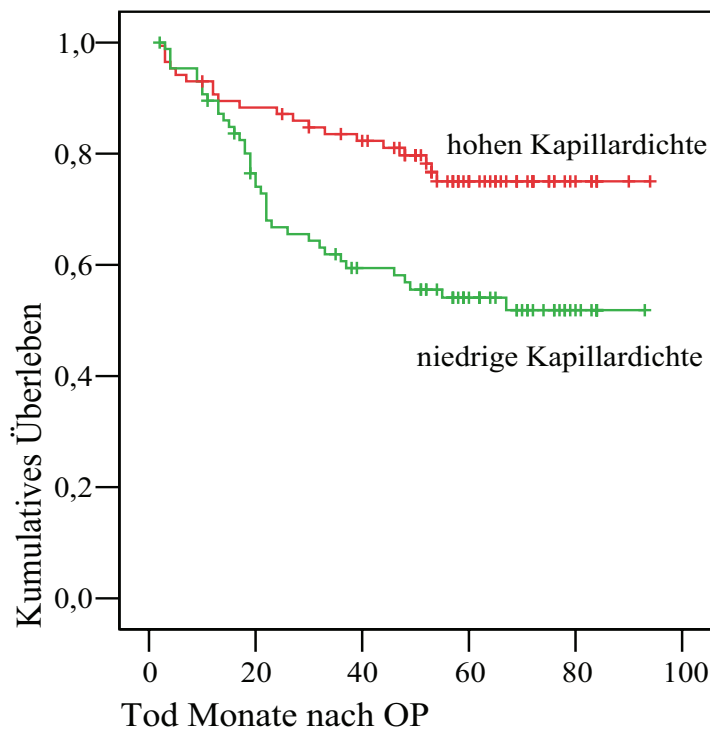


Abb.11: Kaplan-Meier Überlebenskurven für kolorektale Karzinome mit hoher und niedriger Kapillardichte (Tod als klinischer Endpunkt)

Innerhalb des Beobachtungszeitraumes verstarben 45,83% der Patienten in der Gruppe der niedrig kapillarisierten kolorektalen Karzinome bei einer mittleren Überlebenszeit von 60 ± 2 Monaten. 25,62% der Patienten verstarben in der Gruppe mit hoch kapillarisierten

kolorektalen Karzinomen. Die mittlere Überlebenszeit betrug hier 77 ± 3 Monate. Die Unterschiede waren bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,0024$ im log rank-Test für univariate Analysen signifikant.

Es konnten keine medianen Überlebenszeiten errechnet werden, weil die kumulative Sterblichkeit unter 50% lag.

In der Gruppe der potentiell kurativ operierten Patienten ($n = 144$) bildeten sich im Verlauf in 43 (29,86%) Fällen Fernmetastasen. Es ließen sich 28 metachrone Fernmetastasen (41,18%; $n = 68$) für Patienten mit niedrig kapillarisierten kolorektalen Karzinomen bei einem mittleren fernmetastasenfreien Intervall von 62 ± 5 Monaten feststellen. Für Patienten mit hoch kapillarisierten kolorektalen Karzinomen entwickelten sich 15 metachrone Metastasen (19,74%; $n = 76$) bei einem mittleren fernmetastasenfreien Intervall von 81 ± 3 Monaten.

Der Unterschied zwischen niedrig und hoch kapillarisierten Tumoren war hinsichtlich des Auftretens von metachroner Fernmetastasen signifikant ($p = 0,017$; log rank-Test). Eine hohe Kapillardichte in den „hot spots“ kolorektaler Karzinome korrelierte dabei mit einem längeren fernmetastasenfreien Intervall.

Unter 50% der untersuchten Patienten hatten eine Fernmetastase entwickelt, daher konnte nicht die mediane fernmetastasenfreie Zeit berechnet werden.

Die Abbildung 12 lässt den signifikanten Unterschied zwischen gering und hoch kapillarisierten kolorektalen Karzinomen in Bezug auf das Auftreten von metachronen Metastasen erkennen.

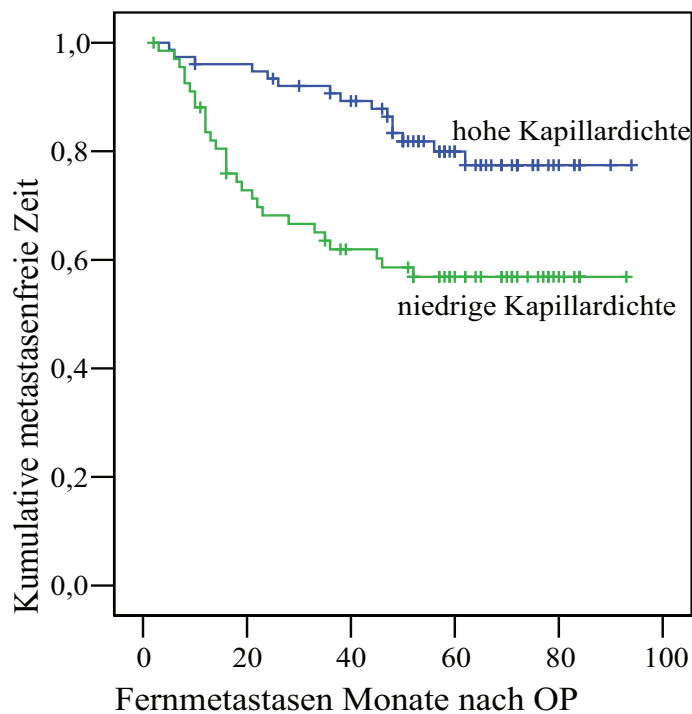


Abb.12: Kaplan-Meier Überlebenskurven für kolorektale Karzinome mit hoher und niedriger Kapillardichte (Fernmetastasen als klinischer Endpunkt)

In der multifaktoriellen Cox-Regressions-Analyse ergab sich unter Berücksichtigung der histopathologischen Parameter wie pT-, pN-, M-, R-Stadium sowie Grading kein unabhängiger, diskriminierender Einfluß der Kapillardichte auf die Prognose.

3.5. Kapillardichte in den Lebermetastasen

In den „hot spots“ der Lebermetastasen befanden sich an der Infiltrationsfront minimal 3 und maximal 101 (Mittelwert $31,9 \pm 22,08$; Median 26), im Metastasenzentrum minimal 1 und maximal 61 Kapillaren (Mittelwert $25,2 \pm 14,71$; Median 24). In zwei Fällen ist das Metastasenzentrum nicht mit angeschnitten gewesen. Die geringere Kapillardichte im Zentrum der Metastasen im Vergleich zur Infiltrationsfront war nicht signifikant ($p = 0,064$; t-Test für unabhängige Stichproben). Gegenüber den Primärtumoren fiel ein deutlich häufigeres Auftreten von ausgedehnten Nekrosezonen, vor allem im Zentrum der Lebermetastasen auf.

Tab.3: Vergleich der Kapillardichte im Randgebiet und im Zentrum von Lebermetastasen

	n	Mittelwert	Standard-abweichung	Median	Min.	Max.
Gesamt	55	37,22	$\pm 20,17$	38	4	101
Rand	55	31,96	$\pm 22,08$	26	3	101
Zentrum	53	25,19	$\pm 14,71$	24	1	61

3.5.1. Kapillardichte in den Lebermetastasen im Vergleich zu den in Primärtumoren

Die mittlere Kapillaranzahl von 51,8 (SD $\pm 24,04$) in den Primärtumoren lag signifikant höher im Vergleich zu der in den Lebermetastasen von 37,22 (SD $\pm 20,17$). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren statistisch signifikant ($p = 0,001$; t-Test für unabhängige Stichproben). In der Abbildung 13 ist der Unterschied der Kapillaranzahl in den kolorektalen Karzinomen und in den Lebermetastasen aufgezeigt.

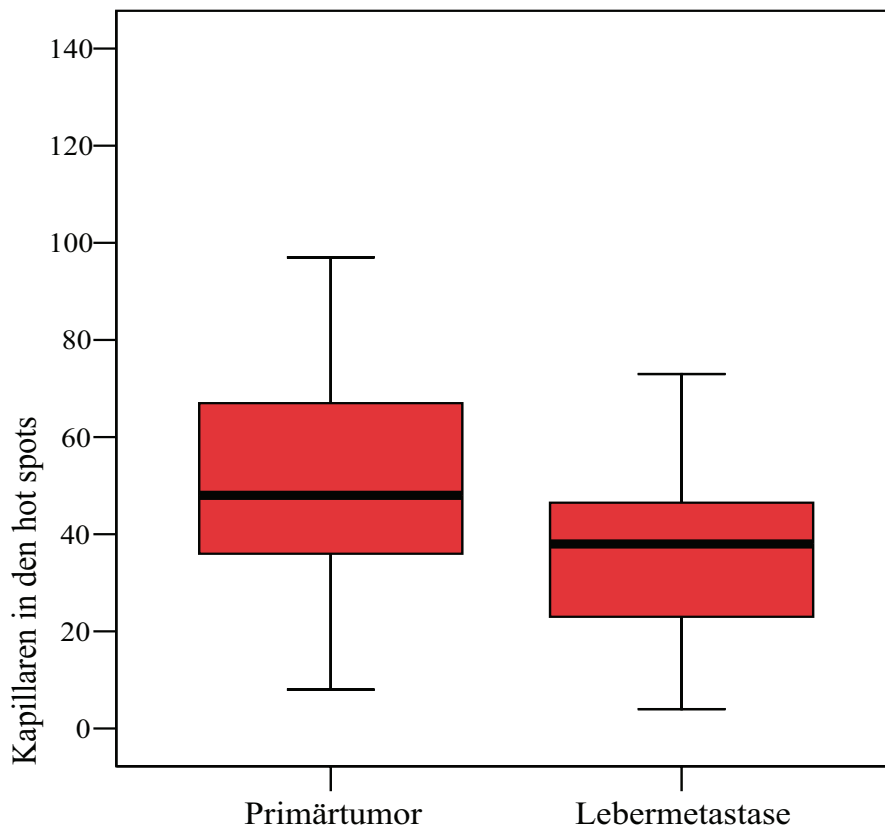


Abb.13: Box plots der Kapillaranzahl für primäre kolorektale Karzinome und für Lebermetastasen

3.6. Kapillararchitektur im kolorektalen Karzinom

In den Karzinomen des Kolons und des Rektums fand sich eine ausgeprägte, intratumorale Heterogenität der Kapillaranordnung. Orte mit vielen Kapillaren wechselten mit gering kapillarisierten Arealen und abschnittsweise fehlten Kapillaren. Auch die Architektur der Kapillaren zeigte eine deutliche intratumorale Heterogenität.

Wie in der Abbildung 14 zu erkennen ist, wurde allgemein eine mehr geordnete, die Tumornester umhüllende, langgestreckte Kapillararchitektur (Formscore 1) in den oberflächlichen Tumorabschnitten beobachtet. Mit zunehmender Infiltrationstiefe zeigten sich eher kurze, fragmentierte, ungeordnete Kapillaren (Formscore 3).

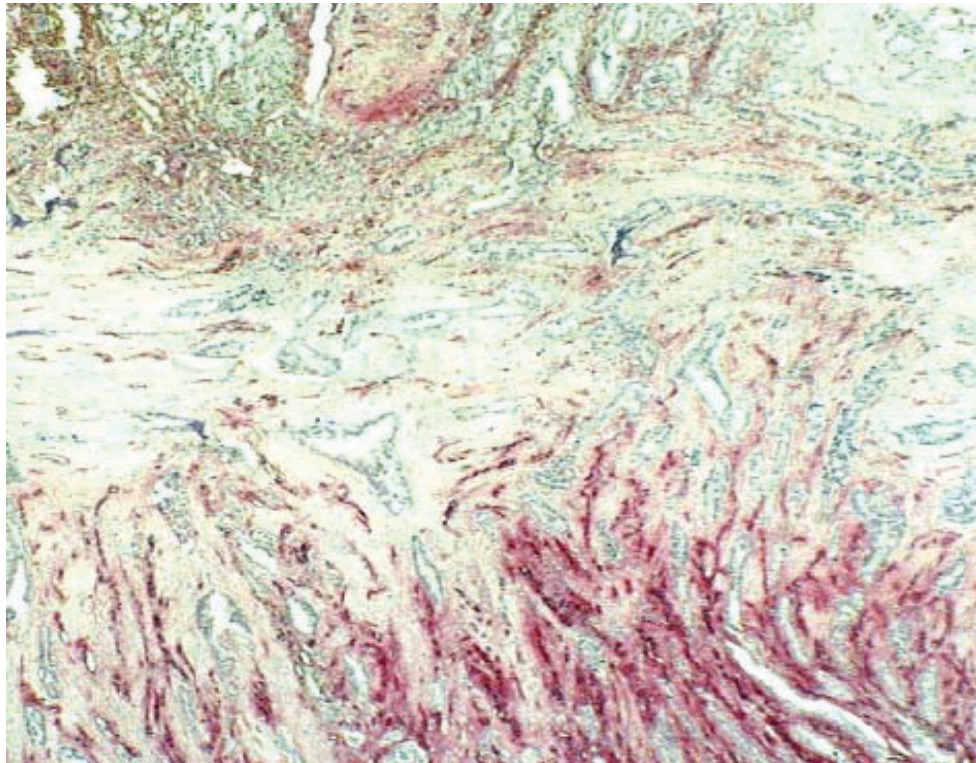


Abb.14: Intratumorale Heterogenität der Kapillaranordnung mit zunehmender Infiltrationstiefe

Neben der intratumoralen Heterogenität der Kapillararchitektur fiel eine noch deutlicher ausgeprägte Heterogenität der Kapillararchitektur zwischen den Tumoren auf. Einige Primärtumoren und Metastasen wiesen überwiegend eine sehr geordnete, die Tumorstränge umhüllende, lang gestreckte und wenig unterbrochene Kapillaranordnung auf. Andere hatten eine sehr ungeordnete, häufig unterbrochene, kurzstreckige, stark verzweigte Kapillaranordnung.

Mit Hilfe der fünf Bildmuster konnten dem Formscore 1 99 (57,2%) Fälle, 39 (22,5%) Fälle Formscore 2 und 35 (20,2%) Fälle Formscore 3 zugeteilt werden. Tumoren mit einem überwiegend geordneten, die Tumornester umhüllenden Kapillarmuster (Formscore 1) hatten mit 56,82 Kapillaren im Mittel eine höhere Kapillardichte als kolorektale Karzinome mit einer zunehmenden Unordnung der Kapillararchitektur. Mit Zunahme von Kapillarabbrüchen, unreifen Kapillaren und unregelmäßigen Verzweigungen konnte gleichfalls eine Abnahme der mittleren Kapillardichte auf 41,97 für den Formscore 3 verzeichnet werden. Tumoren mit dem Formscore 2, welche ungeordnete und geordnete Kapillarmuster zu ungefähr gleichen Anteilen enthielten, hatten eine mittlere Kapillaranzahl von 47,95 pro Gesichtsfeld bei einer 200fachen Vergrößerung.

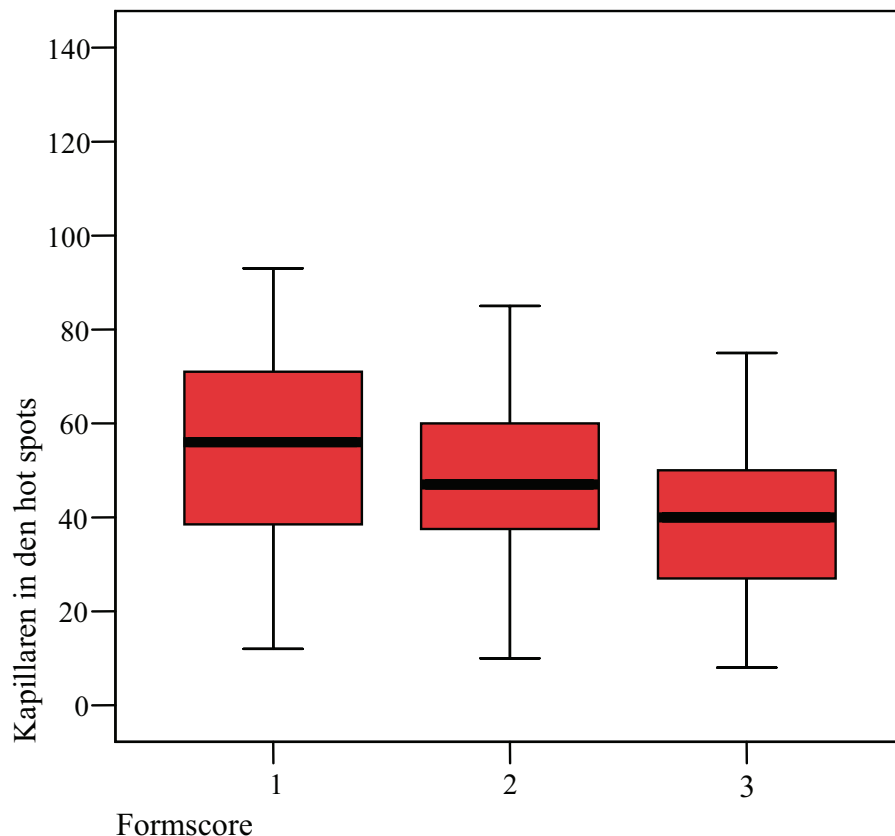


Abb.15: Box plots der Kapillaranzahl für den Formscore 1-3

Der Abfall der Kapillardichte ist in der Betrachtung aller Formscore untereinander für den Formscore 1 gegen den Formscore 3 signifikant gewesen ($p = 0,004$; Post Hoc für Mehrfachvergleiche mit Bonferroni-Abgleich). Die Abbildung 15 verdeutlicht den Abfall der Kapillardichte mit zunehmender Kapillarunordnung.

3.6.1. Kapillararchitektur der kolorektalen Karzinome in Abhängigkeit von klinischen und histopathologischen Daten

Die Kapillararchitektur der kolorektalen Karzinome war in dieser Studie statistisch signifikant assoziiert mit der Eindringtiefe, mit dem Lymphknoten-, Fernmetastasen- und Residualstatus.

Tab.4: Prozentualer Formscore-Anteil in der Gesamtgruppe n = 173 und in Abhängigkeit von den pTNM-Variablen, Differenzierungsgrad und Residualstatus

	Formscore 1 Anteil in %	Formscore 2 Anteil in %	Formscore 3 Anteil in %	Signifikanz
Gesamtgruppe	57,2	22,5	20,2	
pT 1	85,7	-	14,3	0,001
pT 2	86,4	4,5	9,1	
pT 3	58,0	26,0	16,0	
pT 4	36,4	27,3	36,4	
pN 0	80,8	12,8	6,4	0,001
pN 1	41,5	32,1	26,4	
pN 2	33,3	28,6	38,1	
M 0	60,7	22,7	16,7	0.03
M 1	34,8	21,7	43,5	
G 1	73,3	16,7	10,0	n.s.
G 2	50,8	25,4	23,8	
G 3	71,4	14,3	14,3	
R 0	59,6	23,0	17,4	0,001
R 1	25,0	16,7	58,3	

Signifikanzprüfung für mit ANOVA-Test bzw. im Paarvergleich mit t-Test

- n.s. = nicht signifikant

Die Kapillarordnung fiel mit zunehmender Infiltrationstiefe ab ($p = 0,001$; einfaktoriell ANOVA). Im Post Hoc-Test zeigten die pT2-Tumoren im Vergleich zu den pT4-Tumoren hoch signifikant eine geordnetere Kapillararchitektur ($p = 0,001$; einfaktoriell ANOVA) sowie die pT4 gegenüber den pT3 eine signifikant ungeordnetere Kapillararchitektur ($p = 0,017$; einfaktoriell ANOVA).

Kolorektale Karzinome, welche maximal in die Lamina muscularis propria infiltrierten (pT1 und pT2), hatten signifikant häufiger eine geordnete Kapillararchitektur als pT3- und pT4-

Tumore ($p = 0,004$; t-Test für unabhängige Stichproben).

Fanden sich metastatische Lymphknotenabsiedlungen, so ließen sich in den zugehörigen Primärtumoren ein signifikant höherer Anteil ungeordneter Kapillaren darstellen als in den kolorektalen Karzinomen ohne Lymphknotenmetastasen ($p = 0,001$; einfaktoriell ANOVA).

Es gab keine signifikanten Unterschiede der Kapillararchitektur in den Primärtumoren mit dem Lymphknotenstatus pN1 gegenüber pN2.

Kolorektale Karzinome mit Fernmetastasen zum Zeitpunkt der Operation hatten einen signifikant höheren Anteil ungeordneter Kapillaren als pM0-Tumoren ($p = 0,03$; t-Test für unabhängige Stichproben).

Beurteilte man die Kapillararchitektur in den Primärtumoren in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad, konnten keine signifikanten Unterschiede der Kapillarwachstumsmuster gesehen werden. Hier ließen sich nur tendenziell die eher geordnet kapillarisierten Tumoren mit einem Differenzierungsgrad 1 von den eher ungeordnet kapillarisierten Tumoren mit dem Grad 2 auf einem Signifikanzniveau von 0,07 unterscheiden (einfaktoriell ANOVA).

Die kolorektalen Karzinome, welche durch die Operation nicht vollständig resiziert werden konnten, besaßen eine höhere Unordnung der Kapillaren als jene, die vollständig entfernt wurden ($p = 0,001$; t-Test für unabhängige Stichproben).

3.7. Kapillararchitektur als prognostischer Faktor

Die Kapillararchitektur hatte in der vorliegenden Arbeit einen signifikanten Einfluss auf den klinischen Verlauf der Tumorerkrankung. In univariaten Analysen ließ sich mit zunehmender Unordnung der Kapillaren eine Verschlechterung der Prognose erkennen.

Unter den Patienten mit geordnet kapillarisierten Tumoren (Formscore 1) verstarben in der Beobachtungszeit 23 (23,23%; $n = 99$). Innerhalb der Tumoren, die zu annähernd gleichen Anteilen geordnete und ungeordnete Kapillarverläufe (Formscore 2) erkennen ließen, stieg die prozentuale Anzahl der Verstorbenen 35,9% (14 von $n = 39$). Die meisten am kolorektalen Karzinom Erkrankten verstarben in der Gruppe mit ungeordneten Kapillaren (Formscore 3). Hier verstarben von 35 Patienten 22 an der Karzinomerkkrankung (62,86%).

Die mittlere Überlebenszeit sank von Formscore 1 mit 74 Monaten über 66 Monate für den Formscore 2 auf 45 Monate für den Formscore 3.

Die Abnahme der Überlebenszeit war für den Formscore 1 vs. 3 hoch signifikant ($p = 0,001$; Log Rank). Zwischen Formscore 1 vs. 2 und 2 vs. 3 ergab sich nur eine Tendenz zur

Überlebenszeitverkürzung ($p = 0,06$; Log Rank).

Die Kaplan-Meier-Überlebenskurven in Abbildung 16 veranschaulichen die Abnahme der Überlebenszeit mit der Zunahme der kapillären Unordnung im kolorektalen Karzinom.

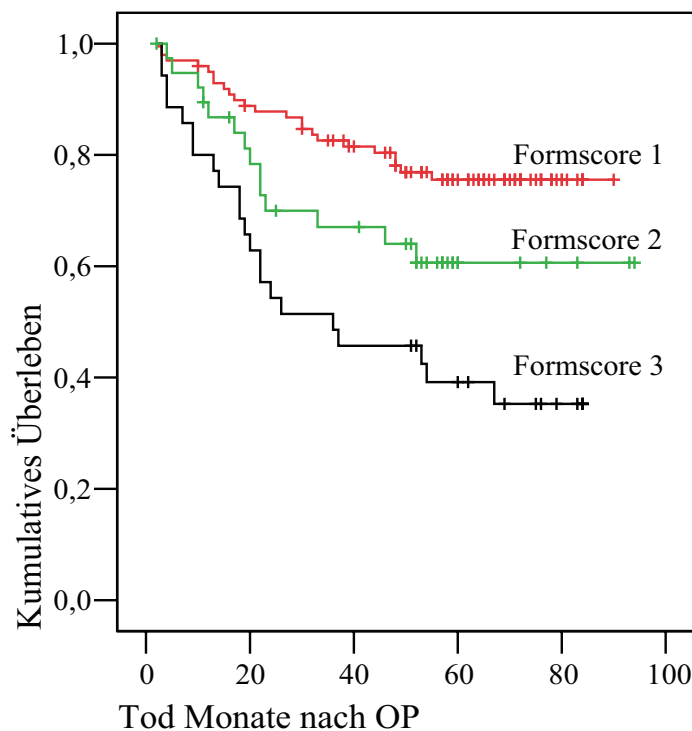


Abb.16: Kaplan-Meier Überlebenskurven für kolorektale Karzinome mit Formscore 1-3 der Kapillararchitektur (Tod als klinischer Endpunkt)

Fernmetastasen traten signifikant häufiger bei Patienten auf, deren Tumoren eine ungeordnete Kapillararchitektur hatten ($p = 0,001$; Log Rank). So fanden sich in 17 Fällen Fernmetastasen in der Gruppe bestehend aus Tumoren mit dem Formscore 1 (19,54%; $n = 87$). Demgegenüber entwickelten 60,87% der Patienten in der Gruppe mit einer ungeordneten Tumorarhitektur (Formscore 3) metachrone Fernmetastasen.

Die mittlere metastasenfreie Zeit war signifikant länger für Erkrankte, deren Karzinome eine geordnete Kapillarstruktur aufwiesen. Im Mittel fanden sich in 77 Monaten keine Metastasen für Patienten geordneter Tumorkapillararchitektur. Demgegenüber stehen 47 metastasenfreie Monate in der Gruppe ungeordneter Kapillarmuster (Formscore 3).

Mit 12 in der Beobachtungszeit aufgetretenen Fernmetastasen (35,29%; $n = 34$) und einer

mittleren metastasenfreien Zeit von 68 Monaten, lagen die Patienten, deren Tumoren zu gleichen Teilen geordnete und ungeordnete Kapillarmuster (Formscore 2) aufwiesen, im mittleren Bereich.

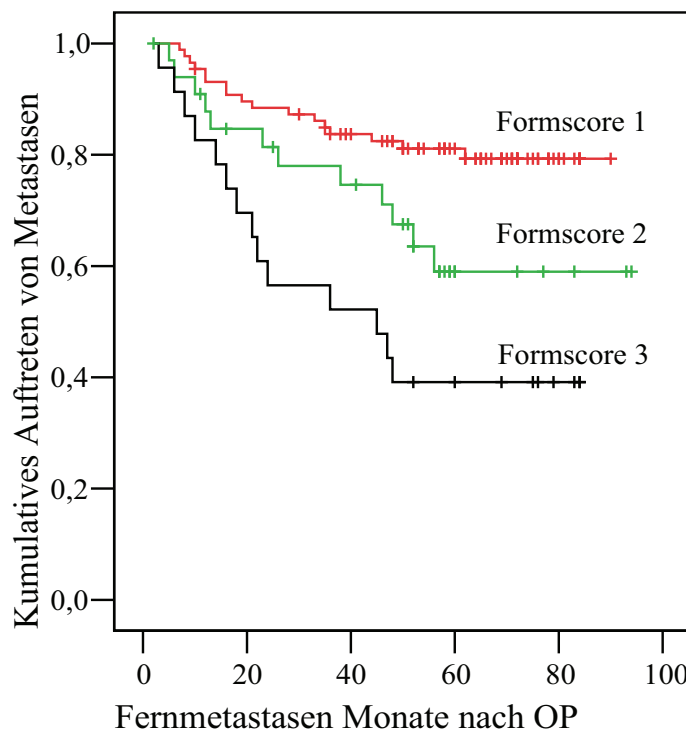


Abb.17: Kaplan-Meier Überlebenskurven für kolorektale Karzinome mit Formscore 1-3 der Kapillararchitektur (Fernmetastasen als klinischer Endpunkt)

Die mit steigendem Formscore abfallenden fernmetastasenfreien Zeiten waren für den Formscore 1 vs. 3 hoch signifikant ($p = 0,001$), für 1 vs. 2 auf einem Niveau von $p = 0,03$ ebenfalls signifikant und für den Vergleich zwischen Formscore 2 vs. 3 mit $p = 0,08$ nur tendenziell unterschiedlich (Log Rank).

In der multivariablen Cox-Regressions Analyse unter Mitbetrachtung prognostisch relevanter Parametern, wie TNM-, G- und R-Status, konnte der Kapillararchitektur- Formscore nicht als ein unabhängiger prognostischer Parameter abgegrenzt werden.

3.8. Kapillararchitektur in den Lebermetastasen

Die Kapillararchitektur in den Lebermetastasen stellte sich gleichfalls sehr heterogen dar. Der Formscore 1 fand sich zu 40%, der Formscore 2 zu 32,7% und der Formscore 3 zu 27,3%. Mit einer prozentualen Aufteilung des Formscore 1 bis 3 im Randbereich der Metastasen von 67,3% - 20,0% - 12,7% war die Kapillararchitektur signifikant geordneter gegenüber dem Metastasenzentrum mit einer prozentualen Formscoreverteilung von 39,6% - 32,1% - 28,3% ($p = 0,004$; t-Test).

Im Vergleich zu den primären kolorektalen Karzinomen fanden sich in den Lebermetastasen tendenziell häufiger eine ungeordnete Kapillararchitektur ($p = 0,053$; t-Test für unabhängige Stichproben).

Die prozentuale Verteilung des überwiegend vorkommenden Formscores in den Primärtumoren wird in Abbildung 18, die in den Lebermetastasen in Abbildung 20 dargestellt. Am häufigsten wurde die Kapillararchitektur in den primären kolorektalen Karzinomen, wie auch in den Lebermetastasen in den Formscore 1 eingestuft. Allerdings zeigte sich eine deutliche Verschiebung zu den Formscore 2 und 3 und damit eine häufiger auftretende Unordnung der Kapillaren in den Lebermetastasen.

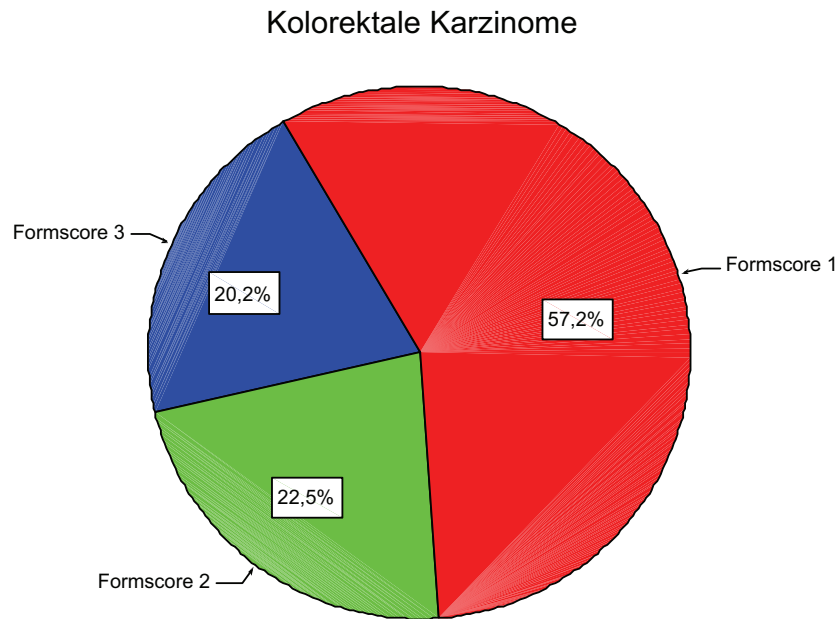


Abb.18: Formscoreverteilung in Prozent in den primären kolorektalen Karzinomen

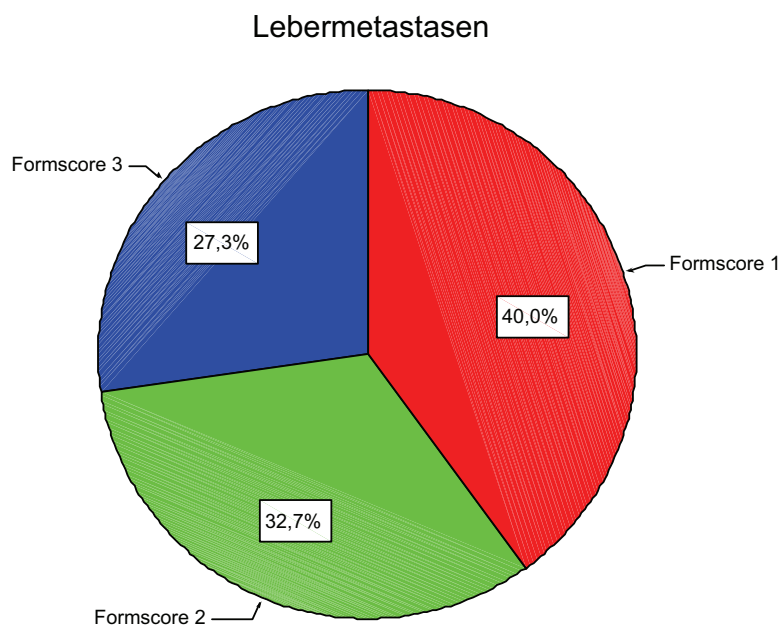


Abb.19: Formscoreverteilung in Prozent in den Lebermetastasen

3.9. Endothelzellproliferation

Vergleich man die Endothelzellproliferationsrate in der normalen Mucosa (prozentualer Anteil 2,3%) mit der im kolorektalen Karzinom (prozentualer Anteil 19,7%) war der Unterschied signifikant ($p < 0,0001$; t-Test).

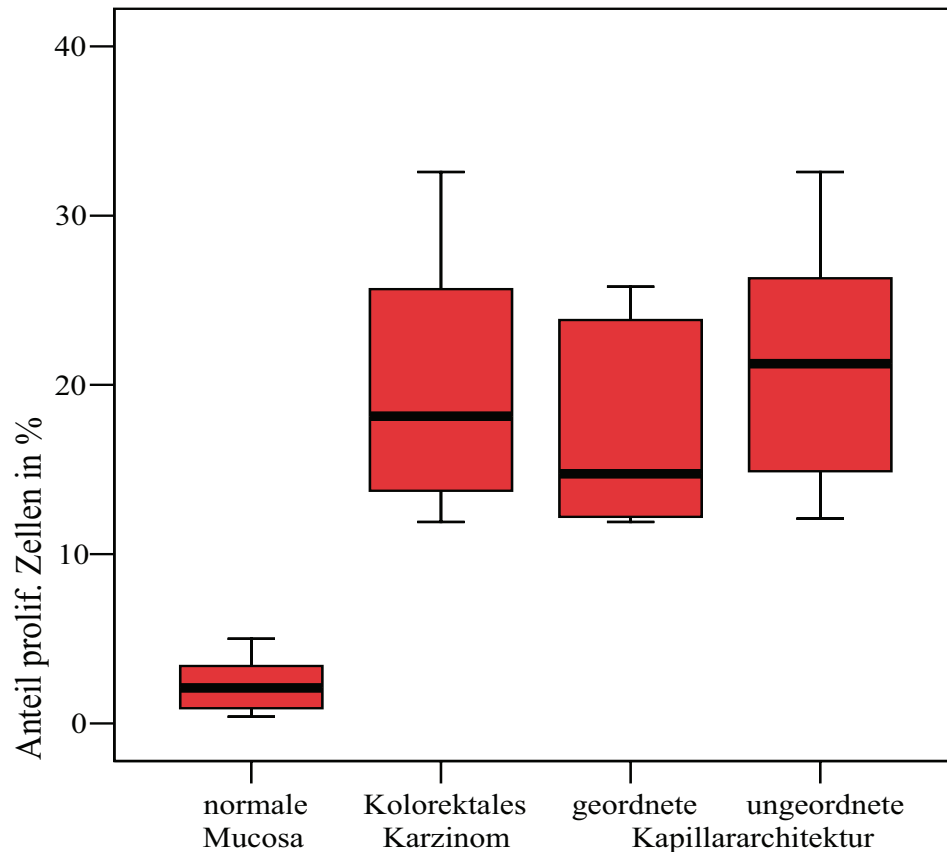


Abb.20: Box plots für Ki67 positiver Endothelzellen in tumorfreier Mucosa, im kolorektalen Karzinom insgesamt, sowie in kolorektale Karzinomen mit geordneter oder ungeordneter Kapillararchitektur

Der prozentuale Anteil proliferierender Endothelzellen zwischen den Tumoren mit geordneter und denen ungeordneter Kapillararchitektur zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p < 0,194$; t-Test). Dabei ließen sich bei den 10 mit dem Formscore 1 eingeschätzten kolorektalen Karzinomen im Mittel 17,6% der Endothelzellen und bei den 10 kolorektalen Karzinomen, die mit dem Formscore 3 eingeschätzt wurden, 21,5% der Endothelzellen anfärben.

4. Diskussion

Die Neoangiogenese ist ein früher und wichtiger Schritt in der Tumorentwicklung. In vielen Studien konnte für solide Tumoren ein Einfluss der Vaskularisation auf den klinischen Verlauf beobachtet werden.

Für das kolorektale Karzinom sind die Ergebnisse über die prognostische Wertigkeit der Tumorkapillarisation widersprüchlich. Der Einfluss der Kapillardichte auf die Prognose der Patienten ist nicht eindeutig geklärt.

Die vorliegende Studie über die Einschätzung der Kapillaren als prognostischer Faktor in kolorektalen Karzinomen basiert auf einer Serie von primär operierten kolorektalen Karzinomen in den Jahren 1994 bis 1996 aus einer Klinik (Chirurgische Universitätsklinik Rostock) und umfasst Tumoren aller UICC-Stadien.

Der überwiegende Anteil der Studien, die sich mit der prognostischen Wertigkeit der Kapillardichte in Tumoren beschäftigten, wählte zur Quantifizierung der Kapillardichte die Methode nach Weidner et al. (1991). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Kapillardichte nach den Richtlinien von Weidner et al. (1991) quantifiziert. Allerdings ist die Methode so modifiziert worden, dass die Orte der höchsten Kapillardichte (hot spots) im Bereich der Infiltrationsfront Betrachtung fanden.

Neben der Kapillardichte wurde als qualitativer Gefäßparameter die Kapillararchitektur untersucht.

Ergänzend war der Vergleich der Kapillardichte sowie Kapillararchitektur in den Primärtumoren und in den Lebermetastasen. Um ein aktives Kapillarwachstum in den Tumoren nachzuweisen, wurde schließlich die Endothelzellproliferation in den Primärtumoren untersucht.

Die Hauptaussagen dieser Studie sind:

1. Mit zunehmender Infiltrationstiefe fiel die Kapillardichte in den „hot spots“ ab, und die Unordnung der Kapillararchitektur nahm zu.
2. In Fällen, in denen zum Zeitpunkt der Operation keine Lymphknoten befallen waren, lagen die Kapillardichte höher und die Kapillararchitektur geordneter vor als in denen mit Lymphknotenmetastasen.
3. Die Primärtumoren der Patienten mit Metastasen zum Zeitpunkt der Operation hatten keine höhere Kapillardichte als die der Patienten ohne synchrone Metastasen.
4. Patienten mit einer Kapillardichte in den Primärtumoren über dem Median zeigten ein längeres Gesamtüberleben als Patienten mit einer Kapillardichte unter bzw. gleich dem Median.

5. Patienten mit kolorektalen Karzinomen, welche ein geordnetes Kapillarnetzwerk aufwiesen, zeigten ein längeres Überleben als die Patienten, bei denen die Karzinome einen geringeren Grad an Kapillarordnung boten.
6. Die Kapillardichte in den „hot spots“ fiel mit der Zunahme des Formscores, d.h. mit zunehmender Kapillarunordnung, ab.
7. Die Kapillardichte war in den Lebermetastasen niedriger als in den Primärtumoren.
8. Die Endothelzellen in den Karzinomen proliferierten lebhafter und der prozentuale Anteil Ki67 positiven Endothelzellen war höher als in der normalen Mucosa.

In der Literatur gibt es mit unseren Ergebnissen zum Teil übereinstimmende und zum Teil abweichende Befunde. Worin könnten die Gründe für die abweichenden Ergebnisse liegen und wo könnten die tumorbiologischen Ursachen dafür liegen, dass eher eine geringe Kapillardichte mit einer schlechteren Prognose verbunden ist.

Um die Ergebnisse der unterschiedlichen Arbeiten zu vergleichen, muss zunächst geprüft werden, ob das untersuchte Patientenkollektiv und die gewählten Schnittpräparate repräsentativ und vergleichbar sind.

Es wurden 173 Patienten in diese Studie aufgenommen. Das Durchschnittsalter betrug 64,9 Jahre (29-90) und entsprach damit etwa vergleichbaren Studien, wie beispielsweise den von Saclarides et al. (1994), die 61,6 Jahre, Tanigawa et al. (1997), die 62,9 Jahre und Abdalla et al. (1999), die 69,5 Jahre im Durchschnitt verzeichneten.

Der Anteil weiblicher (n = 86) und männlicher Patienten (n = 87) ist in der vorliegenden Arbeit ungefähr gleich gewesen. In anderen Studien zeigte sich häufig eine deutlichere Überzahl männlicher Patienten, wie z.B. bei Tanigawa et al. (1997) mit 75 vs. 57, Saclarides et al. (1994) 33 vs. 15, Takebayashi et al. (1996) 108 vs. 58 und Abdalla et al. (1999) mit 65 vs. 46. Das Geschlecht der Patienten beeinflusste in dem überwiegenden Anteil der Studien weder die Kapillardichte noch den klinischen Verlauf, so dass die geringen Unterschiede in der Geschlechtsverteilung als irrelevant für die Betrachtung gewertet werden können (Mooteri et al. 1996; Saclarides et al. 1994; Sternfeld et al. 1999; Takebayashi et al. 1996; Tomisaki et al. 1996; Tanigawa et al. 1997).

Somit kann das Patientenkollektiv in Bezug auf Patientenalter und Geschlechtsverteilung als repräsentativ angesehen werden.

Mit 37% waren die Karzinome in dieser Studie am häufigsten im Rektum lokalisiert, in absteigender Reihe gefolgt vom Sigmoid (22,0%), Zökum und Kolon ascendens einschließlich rechter Flexur (27,2%), Kolon descendens und linker Flexur (8,1%) sowie vom Kolon transversum (5,8%). Dies entsprach der Verteilung anderer Studien, wie beispielsweise bei Lindmark et al. (1996), mit 42,5% der Karzinome im Rektum und 57,5% im Kolon. Abdalla et al. (1999) beschrieben 74,8% Tumore im Kolon und 25,2% im Rektum.

Auch wenn in der Arbeit von Tanigawa et al. (1997) das rechte Kolon mit dem Kolon transversum (30,8%) sowie das linke Kolon mit dem Rektum (69,2%) zusammengefügt wurde, zeigen sich tendenziell ähnliche Häufigkeiten der Lokalisation.

Die kolorektalen Karzinome verteilten sich in unserer Studie mit 13,3% / 31,8% / 38,2% / 16,8% auf die UICC-Stadien I/ II/ III/ IV. Diese Daten zeigen, dass das kolorektale Karzinom lange Zeit „stumm“ verläuft und bei Erstdiagnose häufig ein bereits die Darmwand überschreitender Tumor vorliegt. Aufgrund der modifizierten Dukes-Stadieneinteilung nach Astler-Coller konnte nicht jede Studie zum Vergleich herangezogen werden. Doch wurden die Tumoren nach UICC oder nach der älteren Dukes-Stadieneinteilung kategorisiert, zeigte sich auch in den zu vergleichenden Studien ein überwiegender Anteil der Karzinome im fortgeschrittenen Stadium, so auch bei Tanigawa et al. (1997) mit einer Verteilung von 12% / 30% / 35% / 23%, Bossi et al. (1995) mit 16,3% / 37,6% / 34,3% / 11,8% oder bei Tomisaki et al. (1996) mit 8% / 26,3% / 32,6% und 33,1%.

Ein Vergleich der Tumorverteilung innerhalb der TNM- und Grading-Stadien sowie des Residual-Status gestaltete sich insofern schwierig, da teilweise einzelne Stadien zusammengezogen wurden bzw. in einigen Arbeiten die Daten nicht aufgeführt waren. In der vorliegenden Studie verteilten sich die kolorektalen Karzinome auf die pT-Stadien 1-4 zu 4,1% / 12,7% / 57,8% / 25,4%. Ähnlich zeigte es sich auch in der Arbeit von Sternfeld et al. (1999), in der sich die Tumoren nach ihrer Infiltrationstiefe zu 3% / 18% / 65% / 14% aufgliederten. Gemeinsam ist in den Arbeiten, dass die meisten Tumoren zum Zeitpunkt der Operation bereits über die Lamina muscularis propria hinaus infiltriert waren. Tomisaki et al. (1996) notieren 8% der Tumoren, die sich den pT1- und pT2-Stadien zuordnen lassen und 92% in den Stadien pT3 und pT4. Takebayashi et al. (1996) untersuchten 37% pT1- und pT2-Tumore bzw. 62,6% pT3 und pT4. Hermanek et al. (1994) fanden in einer Arbeit mit 1833 Fällen eine ähnliche Verteilung auf die pT-Stadien 1-4 von 9% / 19% / 61% / 11%.

Eine hinreichende Zuverlässigkeit der Einteilung in die pN-Stadien nach der TNM-Klassifikation ist nur gegeben bei einer standardisierten histologischen Auswertung und mindestens 12 beurteilten Lymphknoten (Hermanek 1997). Da in der hinzugezogenen Literatur keine Angaben über die Anzahl der entfernten Lymphknoten gemacht wurden, war der Vergleich der Tumoren aufgeteilt nach pN-Stadien nur eingeschränkt möglich. In den vergleichbaren Arbeiten wurden kolorektale Karzinome ohne (pN0) und mit Lymphknotenbefall (pN1-2) verglichen. So untersuchten beispielsweise Tomisaki et al. (1996) 45,1% Tumoren ohne und 54,9% mit Lymphknotenmetastasen, Tanigawa et al. (1997) 49,6% vs. 50,4% und Takebayashi et al. (1996) 63,9% vs. 36,1%. Diese Daten zeigten ein ähnliches Verhältnis wie in der vorliegenden Arbeit mit 45,1% lymphknotennegativen und 54,9% lymphknotenpositiven Tumoren.

Mit einer Verteilung von 16,2% / 71,1% und 12,7% hinsichtlich des Differenzierungsgrades I-III waren in dieser Arbeit die Tumoren überwiegend mäßig differenziert. Dieses deckte sich nicht mit den Beobachtungen von Tomisaki et al. (1996) und Takebayashi et al. (1996), die mit 50,3% / 40% und 9,7% bzw. 69,2% / 27% und 3,8% überwiegend G1-Tumoren in ihrem Kollektiv hatten. Allerdings entsprachen unsere Daten denen von mehreren großen Studien mit einer Fallzahl von 709 bei Chapius et al. (1985) sowie Gasser et al. (1992) mit 310 kolorektalen Karzinomen. Hier teilte sich der Differenzierungsgrad prozentual in 9 / 62 / 29 bei Chapius et al. (1985) bzw. 9 / 80 / 11 bei Gasser et al. (1992) auf. Kritisch ist die Einteilung nach dem Differenzierungsgrad zu betrachten, da beim Vorliegen unterschiedlich differenzierter Areale innerhalb eines Tumors sich die Einteilung nach den undifferenziertesten Arealen richtet. Damit wird die Grading-Einteilung nicht der ausgeprägten Heterogenität der Tumoren gerecht (Raymond et al. 1988).

65,9% der Patienten mit einem kolorektalen Karzinom überlebten den Beobachtungszeitraum von ca. 4 Jahren. Die mittlere Überlebensrate lag in der Literatur häufig unter unseren Ergebnissen. Takebayashi et al. (1996) gaben 56% an, Sternfeld et al. (1999) 55%, Saclarides et al. (1994) 33% und Abdalla et al. (1999) 34%. Allerdings ist in diesen Arbeiten das Beobachtungsintervall 5 Jahre, bei Abdalla et al. (1999) sogar über 6,75 Jahre, worin der Grund für die etwas geringeren Überlebensraten liegen könnte.

Zur Rezidivrate gab es in den meisten Arbeiten keine Angaben. Darüber hinaus wurde die Rezidivrate unterschiedlich beschrieben. In einigen Arbeiten sind nur Lebermetastasen oder

nur Lokalrezidive, in anderen Lokalrezidive, hämatogene und lymphogene, metachrone Metastasen zusammengefasst ausgewertet worden.

In der vorliegenden Studie entwickelten sich innerhalb von 4 Jahren bei 29,9% der Patienten mindestens eine metachrone Fernmetastase. Dies ist mit den Ergebnissen von Sternfeld et al. (1999) vergleichbar, die bei 32% der Patienten eine Fernmetastasierung beobachteten.

Die mittlere Kapillardichte in dieser Studie lag bei $51,8 \pm 24,04$ Kapillaren (Median = 48) innerhalb einer Fläche von $0,74 \text{ mm}^2$. Ein Vergleich mit anderen Studien war dahingehend problematisch, weil verschiedene Vergrößerungen zur mikroskopischen Messung benutzt wurden. So benutzten Abdalla et al. (1999) eine 400fache Vergrößerung und zählten im Mittel 4,2 Kapillaren aus. Lindmark et al. (1996) nannten in ihrem Bericht keine mittleren oder medianen Kapillardichten. Sie teilten die Anzahl der Kapillaren in ein Scoresystem von 0-5, 6-10 und über 10 Kapillaren innerhalb fünf Zählungen bei 125facher Vergrößerung ein. In den Arbeiten, die analog zu unserem Studiendesign eine Auszählfläche von $0,74 \text{ mm}^2$ wählten, zeigten sich teilweise ähnliche Werte und Standardabweichungen für die Kapillardichten, so bei Tomisaki et al. (1996), die $32,8 \pm 11,7$ und Sternfeld et al. (1999), die 75 ± 32 Kapillaren notierten. Eine geringere Kapillaranzahl auf einer Fläche von $0,74 \text{ mm}^2$ ermittelten Saclarides et al. (1994) mit $17,4 \pm 5,6$. Höhere Anzahlen fanden sich bei Bossi et al. (1995) mit 115 ± 39 , Tanigawa et al. (1997) mit 112 ± 46 sowie Pavlopoulos et al. (1998) mit 106 Kapillaren. Diese Unterschiede, trotz gleichem Studiendesign, demonstrieren die Subjektivität der Auszählung und deuten auf die fehlende Einheitlichkeit hinsichtlich der Definition einer unter dem Mikroskop abzugrenzenden Kapillare. Allerdings ist die Größe der Werte nicht ausschlaggebend für die Klärung der Fragestellung, sofern alle Tumore innerhalb einer Studie nach dem gleichen Auszählprinzipien untersucht wurden.

Allen Arbeiten gemeinsam ist die hohe Standardabweichung, welche die in fast allen Studien betonte Heterogenität innerhalb und zwischen den Tumoren widerspiegelt.

Somit kann gesagt werden, dass die von uns untersuchten Patienten ein repräsentatives Kollektiv darstellen. Sie unterscheiden sich nicht wesentlich von der Alters- und Geschlechtsverteilung, von den histopathologischen Tumorparametern sowie von den Krankheitsverläufen anderer Patientenkollektive mit kolorektalen Karzinomen.

Sucht man in der Literatur, so findet man eine fast unüberschaubare Anzahl von Arbeiten, welche sich mit dem prognostischen Wert der Tumorkapillarisation beschäftigen. Für einen Vergleich der eigenen Daten ist es allerdings wichtig, Studien mit einer ähnlichen methodischen Struktur zu finden. Nach den Richtlinien von Weidner et al. (1991) untersuchten 9 Studien die Kapillardichte in kolorektalen Karzinomen, die sich wie folgend gliedern lassen:

1. Vier Studien zur Folge korrelierte eine hohe Kapillardichte mit einem schlechten Überleben. Saclarides et al. (1994) berichteten über eine signifikant höhere Kapillardichte bei Patienten, welche den 5-Jahres-Beobachtungszeitraum nicht überlebt haben (48 Fälle, Stadium I bis IV, Faktor VIII Reaktion, 200facher Vergrößerung). Tomisaki et al. (1996) beschrieben eine Zunahme der Kapillardichte mit dem Tumorstadium (175 Fälle von einer Gesamtserie von 645, Stadium I bis IV, Faktor VIII Reaktion, 200facher Vergrößerung). Takebayashi et al. (1996) zeigten einen signifikanten Einfluss der Kapillardichte über den Median auf den klinischen Verlauf in univariaten und multivariaten Analysen (166 Fälle, Stadium I bis III, Faktor VIII Reaktion, 400facher Vergrößerung). Letztlich identifizierte auch die Studie von Tanigawa et al. (1997) die Kapillardichte über den Median als einen unabhängigen, prognostischen Faktor in der Cox Regressions Analyse (133 Fälle, Stadium I bis IV, CD 34 Reaktion, 200 Vergrößerung). Allerdings wurde die Ab- bzw. Anwesenheit von synchronen Metastasen in diesem Modell nicht beachtet.

2. Die zweite Gruppe bilden Studien, die keinen statistisch signifikanten Effekt der Kapillardichte auf die Prognose sahen. Bossi et al. (1995) beschrieben in ihrer Publikation keinen Zusammenhang zwischen Kapillardichte und Tumorstadium sowie keinen Einfluss in univariaten Überlebensanalysen (178 Fälle von kolorektalen Karzinomen mit zusätzlich 36 Adenomen, Stadium I bis IV, CD31 Reaktion, 200facher Vergrößerung). Pavlopoulos et al. (1998) führten eine sehr detaillierte Studie über die Morphometrie der Mikrogefäße in kolorektalen Karzinomen durch. Neben der Kapillardichte in den „hot spots“, welche mit Hilfe eines Computers dargestellt und ausgezählt wurden, betrachtete diese Arbeitsgruppe auch andere morphologische Parameter, wie die stark vaskularisierten Orte (TVA= total vascular area) und die Aufzweigungen der Kapillaren (90 Fälle, Stadium I bis IV, Faktor VIII Reaktion, 200facher Vergrößerung). Sie fanden zwar eine Abnahme der Kapillardichte mit zunehmendem Tumorstadium, aber ein Einfluss der Kapillardichte auf das Überleben konnte nicht festgestellt werden. Allerdings beobachteten sie, dass die Patienten, deren Tumoren weniger Verzweigungen der Kapillaren aufwiesen bzw. eine höhere TVA besaßen, eine

geringere Überlebenschance hatten. Schließlich fanden auch Sternfeld et al. (1999) keine Assoziation der Kapillardichte mit dem Tumorstadium und keinen Einfluss der Kapillardichte über den Median auf das Gesamtüberleben (146 Fälle, Stadium I bis III, CD31 Reaktion, 200facher Vergrößerung).

3. In der Studie von Abdalla et al. (1999) zeigte sich in univariaten Analysen eine bessere Überlebensprognose für Patienten mit Tumoren, deren Kapillardichte über dem Median lag (111 Fälle, Stadium I bis IV, CD31 Reaktion, 400facher Vergrößerung, Chalkley-Auszählung). Ein Zusammenhang zwischen Kapillardichte und Tumorstadium konnte nicht beobachtet werden. Lindmark et al. (1996) untersuchten 212 kolorektale Karzinome im Dukes-Stadium I-IV. Der im Vergleich zu den Endothelmarkern CD31 und UEA-I, die Gefäße am deutlichsten darstellende Antikörper Faktor VIII, ließ keine Abhängigkeit der Kapillardichte von histopathologischen Tumorcharakteristika erkennen. Das Gesamtüberleben war allerdings bei Tumoren mit einer geringen Kapillardichte verkürzt.

Betrachtet man die Ergebnisse aller genannten Studien, so muss man feststellen, dass diese das gesamte Spektrum des möglichen Einflusses der Kapillardichte als prognostischen Faktor umfassen. Somit kann man sagen, dass die Rolle der Kapillardichte im kolorektalen Karzinom noch nicht endgültig geklärt ist.

Diskrepanzen zwischen verschiedenen Studien können methodisch bedingt sein. Zur Diskussion steht häufig der Antikörper, der zur Kapillarfärbung benutzt wird (Faktor VIII vs. CD31 vs. CD34 vs. UEA-I vs. PAL-E vs. BW 200).

Im Vorfeld der Untersuchungen wurde der Faktor VIII mit dem CD31 Antikörper im Hinblick auf ihre Qualität der Färbung verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass beide Antikörper die Endothelien quantitativ etwa gleich anfärben, nur die Intensität der Färbung ist bei Faktor VIII stärker ausgeprägt. Auch Lindmark et al. (1996) verglichen in Voruntersuchungen die Endothelmarker F VIII, CD31 und UEA-I. Alle drei Methoden stellten die Gefäße dar, nur variierte die Intensität der Färbung wesentlich mehr unter der Benutzung von CD31 und UEA-I. Neben den Endothelien markiert UEA-I-Lektin auch Lymphgefäße, selten auch Periozyten und Granulozyten sowie in einigen Studien beschrieben auch neoplastische Zellen (Matsushita et al. 1985; Ordonez und Batsakis 1984). Lymphatische Zellen, wie B-, T-Lymphozyten und auch neutrophile Granulozyten werden von dem Antikörper CD31 angefärbt, so dass es zu höheren Kapillaranzahlen kommen kann.

Der Antikörper PAL-E lässt sich nur an Gefrierschnitten anwenden und ist daher für die vorliegende Untersuchung nicht geeignet (Porschen et al. 1989; Ruiter et al. 1989; Schlingmann et al. 1985).

In dieser Arbeit wurde zur Darstellung der Gefäße der Antikörper gegen Faktor VIII benutzt. In einzelnen Fällen kam es bei diesem Antikörper zu einer Anfärbung von Thrombozyten. Aufgrund der morphologischen Unterscheidung fiel eine Differenzierung gegenüber den Kapillaren nicht schwer. Eine unspezifische Hintergrundfärbung konnte in wenigen Fällen beobachtet werden. Wenn dadurch die Auswertung beeinträchtigt war, wurde die Reaktion wiederholt.

Auch wenn in der Studie von Little et al. (1986) die Überlegenheit von UEA I und in der von Ruiter et al. (1989) sowie Alles und Bosslet (1986) die Überlegenheit von BW 200 gegenüber Faktor VIII gezeigt wurde, ist es der Faktor VIII Antikörper, der in den vergleichbaren Studien am häufigsten Anwendung fand und somit am ehesten für einen Vergleich in Frage kommt. Darüber hinaus können die Unterschiede in den Ergebnissen der einzelnen Studien nicht ausschließlich über den verwendeten Antikörper erklärt werden.

Es kann bei einem Untersucher zu falsch hohen Kapillardichten kommen, wenn dieser nicht beachtet, dass der Antikörper auch mit „nicht-endothelialen“ Zellen oder Gewebebestandteilen reagieren kann. Sicherlich können die Werte für den Mittelwert oder den Median der Kapillardichte zwischen den einzelnen Studien unterschiedlich sein, aber benutzt man nur einen von den für die Gefäßdarstellung üblichen Antikörpern, so sollte zumindest die Tendenz bzw. das Verhältnis der Kapillardichte innerhalb einer Studie vergleichbar sein.

Für die quantitative Beschreibung der Tumorgefäße wurden unterschiedliche Gefäßparameter untersucht, wie die Anzahl der Kapillaren, relatives oder absolutes Kapillarvolumen, Gefäßlänge, Gefäßdurchmesser und Gefäßoberfläche.

Bei der Auswahl der Gefäßparameter muss man kritisch beurteilen, welcher Parameter die Kapillardichte am besten repräsentiert.

Schnelles Tumorwachstum, insuffizienter Lymphabfluß und erhöhte Kapillarpermeabilität der neu gebildeten, unreifen Tumorgefäße bedingen einen hohen hydrostatischen Druck innerhalb des Tumors und begünstigen zusammen mit einer fehlenden Gefäßmuskulatur und fehlenden nervalen Regulation einen Gefäßkollaps im Tumor. Somit zeigen sich Volumen und Durchmesser der Gefäße von diesen Parametern abhängig. Auch die Gefäßoberfläche und der Gefäßdurchmesser sind abhängig von den häufig in Tumoren vorkommenden Sinusoiden und

Aneurysmata (Algire 1954; Warren 1979). Daher könnte durch die Benutzung von Gefäßparametern wie Volumen, Durchmesser und Gefäßoberfläche eine zu geringe Kapillardichte gemessen werden. Einige Arbeitsgruppen untersuchten nicht nur einen Gefäßparameter, sondern mehrere (Porschen et al. 1989; Srivastava et al. 1988). Dabei zeigten innerhalb einer Studie einige Gefäßparameter einen Zusammenhang mit histopathologischen Tumormerkmalen, andere wiederum nicht. Porschen et al. (1989) wiesen am kolorektalem Karzinom ein signifikant größeres Gefäßvolumen in T1- und T2-Tumoren gegenüber T3- und 4-Tumoren nach, wohingegen kein Unterschied für das Kapillarovolumen festgestellt werden konnte. Innerhalb der einzelnen Studien sollten die Gefäßparameter zumindest eine gleichsinnige Richtung haben. Allerdings sind einige Gefäßparameter durch die oben genannten Faktoren so beeinflusst, dass teilweise gegensätzlich scheinende Ergebnisse beschrieben wurden, obwohl alle Parameter ein Kriterium beschreiben sollten, nämlich die Kapillardichte. Besonders geeignet erscheint daher ein möglichst unabhängiger Gefäßparameter.

Die Anzahl der Gefäße ist ein Parameter, welcher weitestgehend unabhängig von Gewebedruck, Thrombosen, Sinusoiden usw. ist.

Chalkley schrieb schon 1943 in seinem Bericht, dass ein Punkt, der auf einer zufälligen Bahn das Gewebe durchzieht, so oft auf bestimmten Gewebekomponenten zum liegen kommt, wie es dem Verhältnis ihres Volumen zum Gesamtvolumen entspricht. Damit steigt die Wahrscheinlichkeit ein Tumorgefäß als Anschnitt im histologischen Präparat zu erkennen mit der Anzahl der Gefäße. Daher ist die Kapillaranzahl (Kapillardichte) ein Maß für einen mehr oder weniger gut kapillarisierten Tumor. Dieser Gefäßparameter ist am häufigsten verwendet worden und ist somit auch am ehesten für einen Vergleich geeignet.

Die Anzahl der Kapillaren ist dahingehend kritisch zu beurteilen, dass dieser Parameter nicht unmittelbar und linear die Tumordurchblutung beschreibt. Sie ist von mehreren Faktoren abhängig, wie Blutviskosität und Gefäßwiderstand, welcher sich aus der Gefäßanzahl, -form, -länge und -durchmesser ergibt (Jain 1988). In kavernös erweiterten Tumorgefäßen kommt es häufiger zu Blutstase und Thrombosen. Durch ein schnelles Wachstum des perikapillären Tumorgewebes kommt es weiterhin zu einer Gefäßkompression (Tannock und Steel 1969). Das heißt, dass trotz einer hohen Kapillardichte der Tumor schlecht perfundiert sein kann. Tumorzellen, welche diese nicht perfundierten Gefäße penetrieren, gelangen auch nicht in den Körperkreislauf. Dadurch könnte sich eine mangelnde prognostische Bedeutung trotz guter Kapillarisation erklären.

Aus dem Gesagten ergibt sich, dass die besondere Struktur der Tumorgefäße einer zusätzlichen Betrachtung bedarf. Pavlopoulos et al. (1998) beobachteten mehr Gefäßabbrüche und Gefäßverzweigungen in kolorektalen Karzinomen als in Adenomen und normaler Mucosa. Mit zunehmendem Dukes-Stadium nahm die Kapillaranzahl ab. Weiterhin sah diese Arbeitsgruppe einen schlechteren klinischen Verlauf mit zunehmenden Gefäßabbrüchen.

In Anlehnung an Pavlopoulos et al. (1998) beurteilten wir neben der Kapillaranzahl auch die Kapillararchitektur.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass erstens die Anzahl der Kapillaren ein gut vergleichbarer und annähernd unabhängiger Parameter zur Einschätzung der Kapillardichte im Tumor ist. Zweitens scheint die Beurteilung der Kapillararchitektur neben der Kapillaranzahl ein zusätzlicher, wichtiger Parameter zu sein.

Kolorektale Karzinome zeigen eine ausgeprägte intra- und intertumorale Heterogenität der Gefäßverteilung. Bei dieser Kapillarverteilung ist es schwer, einen repräsentativen Tumorabschnitt zu definieren. Die zufällige Gesichtsfeldauswahl, welche die Kapillaren über die Fläche eines beliebigen Tumorschnittpräparates auszählt, ist von der intratumoralen Heterogenität stark abhängig. Ob das gewählte Schnittpräparat die Vaskularisation für den gesamten Tumor repräsentativ darstellt, ist fraglich.

Die „hot spot“-Methode dagegen geht davon aus, dass am ehesten die Tumorzellen, die im Besonderen zur Neoangiogenese fähig sind, das nötige Potential zur Metastasierung tragen und entscheidend für die Tumorausbreitung sind (Weidner et al. 1991).

Allerdings auch unter den Arbeiten, die die „hot spot“-Methode zur Quantifizierung der Gefäße anwenden, existieren wesentliche Unterschiede, so dass die Wahl zwischen der „hot spot“- Methode oder der zufälligen Gesichtsfeldauswahl nicht die Ursache für die fehlende Ergebnisgleichheit sein kann.

Die Unterschiede in der Größe des Gesichtsfeldes für die Kapillarzählung stellt maximal, wie bereits oben besprochen, ein Problem in der Vergleichbarkeit der Daten dar. Sind allerdings innerhalb der Studien alle Tumoren standardisiert beurteilt, ist die Größe der Fläche von untergeordneter Bedeutung zur Lösung der Fragestellung.

Im Gegensatz zum Mammakarzinom, das in ein weniger vaskularisiertes Gewebe hineininfiltiert, wachsen die kolorektalen Karzinome in einer reichlich vaskularisierten Submukosa und Tunica muscularis propria. Auch an der Grenzzone zur Muskelschicht zeigte sich in der Subserosa ein dichtes Netz von präformierten Gefäßen. Bei der Auswahl der

Auszählungsorte (hot spots) ist es sehr schwer, die schon präformierten Kapillaren, welche sicherlich nicht durch die Neoangiogenese des Tumors induziert worden sind, zu erkennen und aus der Bewertung herauszulassen.

Nimmt man beispielsweise die präformierten Gefäße im Bereich der zur Muscularis angrenzenden Subserosa mit in die Bewertung auf, könnte eine Tendenz für mehr Kapillaren in tiefer infiltrierten Tumoren vorgetäuscht werden. So könnten die Ergebnisse von Saclarides et al. (1994), Takebayashi et al. (1996) und Tanigawa et al. (1997), welche eine steigende Kapillardichte mit Zunahme der Infiltrationstiefe beschrieben, zustande gekommen sein. Tomisaki et al. (1996) und Sternfeld et al. (1999) sahen allerdings keinen entsprechenden Zusammenhang. Alle diese Studien zählten die Kapillaren in den „hot spots“ unabhängig von ihrer Lokalisation.

Weiterhin zeigten große Tumoren teilweise tiefe Ulzerationen, in deren Grund sich Granulationsgewebe entwickelte. Die dabei induzierten Kapillarsprossen sind eher der Entzündungsreaktion zuzuschreiben als dem Tumor selber und können zu unberechtigten „hot spots“ führen.

In aggressiv wachsenden Karzinomen mit einem stark infiltrativen Ausbreitungsmuster ist es ausgesprochen schwierig, die neu gebildeten Tumorkapillaren von den vorbestehenden Kapillaren in der Tunica muscularis, die in ihrer geordneten Struktur stark zerstört ist, zu unterscheiden. Wenn der Untersucher diese Phänomene nicht beachtet, erklärt dies für ca. 25% der kolorektalen Karzinome die trügerisch hohen Werte der Kapillardichte bei Tumoren mit schlechter Prognose (Jass et al. 1986).

Neben dem Nichtbeachten von präformierten Gefäßen, Ulzerationen und entzündlichen Infiltraten ist die Wahl der Auszählungsorte von entscheidender Bedeutung und könnte gleichfalls für die divergierenden Ergebnisse, trotz sorgfältig und ähnlich standardisiert durchgeführten Studien, verantwortlich sein.

Insgesamt fanden wir häufiger eine hohe Kapillardichte und eine geordnete Kapillararchitektur in oberflächlichen Infiltrationsebenen. In tiefen Schichten fand sich eher eine ungeordnete Architektur und weniger Kapillaren. Dabei zeigte sich ein in den meisten Präparaten zu beobachtender mehr oder weniger gleichmäßiger Übergang von geordneten, zahlreichen Kapillaren in oberflächlichen Schichten zu ungeordneten, wenigen Kapillaren in tiefen Schichten.

Der größte Teil der Studien, welche sich mit der Kapillardichte als einem prognostischen Faktor beschäftigten, werteten die Kapillardichte in Anlehnung an die Methode von Weidner

et al. (1991) unabhängig der intratumoralen Lokalisation in den so genannten „hot spots“, den Arealen mit der höchsten Kapillardichte aus. In einige Studien (Abdalla et al. 1999), wie auch in der vorliegenden, werden in Anlehnung an die Methode von Weidner et al. die Kapillaren in den „hot spots“ beurteilt, allerdings im Bereich der tiefsten Infiltrationsfront des Tumors. Diese Modifizierung der Methode von Weidner et al. (1991), welche die Kapillardichte an Mammakarzinomen untersuchte, stellt einen wesentlichen Unterschied in der Wahl der Auszählungsorte dar.

Benutzt man diese Methode der Kapillarauszählung auch für die Untersuchung kolorektaler Karzinome, muss man den Unterschied im Wachstumsmuster zwischen Brust- und kolorektalen Karzinom berücksichtigen. Die initiale karzinomatöse Transformation ist bei den sich überwiegend zentrifugal im Brustgewebe ausbreitenden Karzinomen im fortgeschrittenen Stadium nicht mehr eindeutig lokalisierbar. Die Unterscheidung der Areale mit Tumorzellen, die gerade erst entstanden sind, von solchen, die schon länger bestehen und dadurch einen zeitlichen Vorlauf in der Neoangiogenese haben, ist dadurch erschwert. Damit ist eine Untersuchung der „hot spots“ unabhängig von der Lokalisation in Mammatumoren gerechtfertigt.

Anders ist es bei den kolorektalen Karzinomen, in denen primär die karzinomatöse Transformation von der Mucosa ausgeht und die Tumorzellen per continuitatem in die tieferen Schichten infiltrieren. Hier lassen sich Areale mit „jüngeren“ Tumorzellen im Bereich der Infiltrationsfront von Arealen mit „älteren“ Tumorzellen im Bereich der Ausgangszone (Tumorbasis) unterscheiden. Die „älteren“ im Bereich der Tumorbasis vorkommenden Tumorzellen induzieren bereits über einen längeren Zeitraum die Neoangiogenese. Zudem summieren sich die präformierten Gefäße, die überwiegend im Bereich der basisnahen Tumorschichten zu finden sind, mit den Kapillaren der Neoangiogenese. Beurteilt man die Kapillardichte unabhängig von ihrer Lokalisation, ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die Wahrscheinlichkeit einen „hot spot“ zu finden in der Nähe der Tumorbasis höher ist als an der Infiltrationsfront.

Saclarides et al. (1994), Tomisaki et al. (1996), Takebayashi et al. (1996) und Tanigawa et al. (1997) beurteilen die „hot spots“ unabhängig von ihrer Lokalisation. Diese Studien verbinden eine hohe Kapillardichte mit einer schlechten Prognose und sehen zum Teil eine Zunahme der Kapillardichte mit steigendem Tumorstadium bzw. zunehmender Infiltrationstiefe. Abdalla et al. (1999), welche überwiegend die „hot spots“ in tieferen Abschnitten fanden und die vorliegende Studie, welche die „hot spots“ im Bereich der Infiltrationsfront auszählte, sahen eine geringe Kapillardichte mit einer schlechteren Prognose verbunden. Weiterhin lässt sich

in der vorliegenden Arbeit eine Abnahme der Kapillardichte mit zunehmender Infiltrationstiefe verzeichnen. Abdalla et al. (1999) vergleichen nur die Kapillardichte in den einzelnen Tumorstadien und finden keine signifikanten Unterschiede.

Daraus ergibt sich schließlich, dass durch die Auswahl der „hot spots“, unabhängig von ihrer Lokalisation, diese mit hoher Wahrscheinlichkeit auch bei fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen eher im Bereich der Submucosa oder Muscularis gefunden werden. In diesen Bereichen kann außerdem durch die häufiger vorkommenden präformierten Kapillaren sowie durch die bereits über einem längeren Zeitintervall bestehenden tumorinduzierte Neoangiogenese eine deutlich höhere Kapillaranzahl ausgezählt werden. Diese Studien werden häufiger eine hohe Kapillardichte mit fortgeschrittenen Tumoren und damit auch eine schlechtere Prognose mit stark kapillarisierten Tumoren assoziieren.

Beurteilt man andererseits die Kapillaren in den „hot spots“ im Bereich der Infiltrationsfront, so befinden sich die Auszählungsorte bei fortgeschrittenen Tumoren (pT3 und pT4) im perikolischen oder perirektalen Fettgewebe bzw. in subserösen Arealen. Hier findet sich zum einen nur eine geringe Zahl praeformierter Gefäße. Zum anderen ist im Bereich der Infiltrationsfront das zeitliche Intervall der Tumorneoangiogenese im Gegensatz zur Tumorbasis kürzer. Damit lassen sich an diesen Orten eher wenige, unreife, unstrukturierte von „jungen“ Tumorzellen induzierte Kapillaren erkennen. Durch fehlende praeformierte Gefäße und eine kürzere Zeitspanne für die tumorinduzierte Neoangiogenese führen die Kapillarzählungen im Bereich der Infiltrationsfront mit höherer Wahrscheinlichkeit zu niedrigen Werten der Kapillaranzahl. In diesem Zusammenhang verbinden sich fortgeschrittene Tumoren und ein schlechter klinischer Verlauf eher mit einer geringen Kapillardichte.

Wie oben beschrieben stellen sich im Bereich der Infiltrationsfront, im Gegensatz zur Tumorbasis, überwiegend nur die vom Tumor induzierten Kapillaren dar. Sie repräsentieren damit am ehesten die Neoangiogenese eines Tumors.

Unterstützt wird dieser theoretische Ansatz durch die Beurteilung der Kapillararchitektur. In der vorliegenden Arbeit fand sich eine geordnete Kapillararchitektur analog zu einer hohen Kapillardichte häufiger im Bereich der Tumorbasis. Mit zunehmender Infiltrationstiefe nahmen sowohl die Kapillarordnung, als auch die Kapillardichte ab. Auch Pavlopoulos et al. (1998) erkannten eine Häufung der Kapillarabbrüche und eine Abnahme der Kapillaranzahl mit Zunahme des Tumorstadiums.

Berücksichtigt man den zeitlichen Verlauf des Tumorwachstums, so induzieren die

Tumorzellen im Bereich der Tumorbasis über einen längeren Zeitraum die Neoangiogenese. Die Endothelzellen können über ein längeres Zeitintervall wachsen und reifen. Sie bilden mit den strukturierten präformierten Gefäßen eine mehr geordnete Kapillararchitektur in basalen Tumorbereichen. Gegensätzlich dazu verhält sich das Kapillarbild in tieferen Abschnitten, im Bereich der Infiltrationsfront. Im perikolischen oder perirektalen Fettgewebe sieht man wenige, ungeordnete, praeformierte Gefäße. Die Kapillaren in diesem Bereich sind eher Kapillaren der Tumorneoangiogenese. Die Kapillaren sind hier von den „jungen“ Tumorzellen induziert und haben ein kurzes Wachstumsintervall. Darüber hinaus finden sich im perikolischen oder perirektalen Fettgewebe durch Selektion eher schnell wachsende, aggressive Tumorzellklone. Die Endothelzellen haben weniger Zeit zu reifen und zu wachsen, sie werden zusätzlich durch nicht abtransportierte, übermäßig anfallende Stoffwechselprodukte toxisch geschädigt. Es entstehen somit wenige, abgebrochene, durch mangelnde Basalmembranauskleidung sinusoidal und aneurysmatisch erweiterte, unreife Kapillarsprossen. Sie prägen das Bild in tieferen Infiltrationsebenen.

Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass eine hohe Kapillardichte und eine geordnete Kapillararchitektur eher in Infiltrationsebenen zu finden sind, die oberflächlich liegen (pT1 und pT2). In tieferen Infiltrationsebenen (pT3 und pT4) lässt sich häufiger eine geringe Kapillardichte und eine eher ungeordnete Kapillararchitektur erkennen. Dieser theoretische Ansatz wird in den Ergebnissen dieser Studie bestätigt.

Es ist somit wichtig den Auszählungsort im Bereich der Infiltrationsfront zu wählen. Hier lässt sich zum einen mit der höchsten Wahrscheinlichkeit die tumorinduzierte Neoangiogenese beurteilen. Zum anderen werden bei der Wahl eines „hot spots“ als Auszählungsort in der Submucosa oder in der Lamina muscularis propria bei pT3- oder pT4-Tumoren durch die hohe Anzahl präformierter Gefäße und die länger bestehende Neoangiogenese, die unberechtigte Zuordnung hoher Kapillardichten mit fortgeschrittenen Tumoren vermieden.

Nur Takebayashi et al. (1996) und Tanigawa et al. (1997) ermittelten die Kapillardichte in univariaten und multivariaten Analysen als eine Einflussgröße für den klinischen Verlauf. Im überwiegenden Anteil der Studien, wie auch in der vorliegenden Arbeit, zeigte sich, wenn überhaupt, die Kapillardichte nur in univariaten Analysen als ein Prognosefaktor (Abdalla et al. 1999; Banner et al. 1998; Lindmark et al. 1996; Saclarides et al. 1994; Tomisaki et al. 1996). In multivariaten Analysen mit allen bekannten und als Prognoseparameter akzeptierten Faktoren konnte die Kapillardichte nicht als prognostischer Einflussfaktor herausgearbeitet

werden. Es scheint, dass die Kapillardichte im kolorektalen Karzinom nur einen geringen prognostischen Stellenwert hat.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Endothelzellproliferation im Tumorgewebe höher ist als in der normalen Mucosa. Hildenbrand (1999) untersuchte die Gefäße in 40 kolorektalen Karzinomen und in 21 Präparaten mit tumorfreier Mucosa. Sie benutzte drei Gefäßparameter zur Quantifizierung der Gefäße, erstens die Kapillaranzahl, zweitens die Gesamtgefäßdichte nach der „hot spot“-Methode und drittens die Gesamtgefäßdichte in ausgewählten Gewebeabschnitten. Alle drei Parameter zeigten eine signifikant höhere Ausprägung im Karzinomgewebe als in der normalen Mucosa.

Auch Bossi et al. (1995) und Pavlopoulos et al. (1988) konnten eine signifikant höhere Kapillardichte in kolorektalen Karzinomen im Vergleich zur Mucosa bestätigen. Es kann deshalb geschlussfolgert werden, dass die kolorektalen Karzinomzellen die Neoangiogenese induzieren. Auch stellte sich die Kapillardichte in vielen oben genannten Studien als ein prognostisches Kriterium dar. Somit findet die Neoangiogenese im kolorektalen Karzinom statt und lässt auch einen prognostischen Einfluss erkennen. Allerdings ist dieser prognostische Einfluss wesentlich sensibler und störanfälliger als der bei den etablierten Prognosefaktoren. In den meisten multivariaten Analysen kristallisierte sich die Kapillardichte neben den gesicherten Prognosefaktoren nicht als ein prognostischer Faktor heraus. Univariate Analysen benötigten eine hohe Fallzahl, um signifikante, prognostische Unterschiede der Kapillardichte zu erkennen. Die Neoangiogenese ist im Tumor sehr heterogen und von vielen Faktoren abhängig. Die Methoden der Kapillarquantifizierung sind nicht genügend standardisiert und störanfällig.

Diese multifaktorielle Problematik kann zu den beschriebenen unterschiedlichen Ergebnissen in der Literatur führen.

Wenn die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen, stellt sich die Frage, wo die Gründe in der Tumorbilogie liegen.

Wie mit Hilfe der Ki 67 / Faktor VIII Doppelmarkierung demonstriert werden konnte, besitzen kolorektale Karzinome einen hohen Anteil proliferierender Endothelzellen und gehören zu den von der Angiogenese abhängigen Karzinomen (Pezzella et al. 1997). Daher ist die Neoangiogenese das Produkt der kolorektalen Karzinome, aber eine hohe Kapillardichte assoziierte sich in der vorliegenden Studie eher mit einer guten Prognose.

Eine mögliche Erklärung für den Mangel an prognostischer Bedeutung könnte die Assoziation einer hohen Kapillardichte mit der lymphohistiozytären Reaktion sein. Die lymphohistiozytären Infiltrate können Endothelwachstumsmediatoren ausschütten, welche zur Proliferation der Kapillaren führen. Die Korrelation einer hohen Kapillardichte mit einem besseren Überleben könnte somit ein sekundäres Phänomen sein, die Gründe für die gute Prognose in einer so genannte „Host“-Reaktion liegen, d.h. eine effektivere körpereigene Abwehr auf den Tumor, welche sich in der lymphohistiozytären Infiltration widerspiegelt.

Eine weitere Erklärung dafür, dass eine hohe Kapillardichte und eine geordnete Kapillararchitektur mit einem besseren klinischen Verlauf zusammenhängen, könnte in der besseren Perfusion des Tumors liegen. Chemotherapeutika gelangen bei einem gut kapillarisierten Tumor besser an den Wirkort als bei einem schlecht durchbluteten Tumor. Durch die geringe Diffusionsstrecke der dicht an und um die Tumorzellen verlaufenden Kapillaren ergibt sich ein besserer Wirkungsgrad der adjuvanten Chemotherapie. Wichtig für den Erfolg einer Radiotherapie ist die lokale Oxygenierung des Tumors. Ebenso wird die Temperaturverteilung während einer Hyperthermiebehandlung von der Perfusion beeinflusst (Jain 1988).

Die möglicherweise effektivere Wirksamkeit der Therapie macht eine bessere Prognose bei gut perfundierten Tumoren verständlich.

Andererseits liegt aber die Überlegung nahe, dass die Tumorzellen in einem dicht anliegenden, geordneten Gefäßverband schneller zu einer Tumorabsiedlung führen als in einem diffusen, inhomogenen, teilweise durch breite Bindegewebssepten von den Tumorzellverbänden getrennten Gefäßareal. Hier scheint allerdings ein lokal, quantitativ hoher Wirkungsgrad der adjuvanten Therapie eine höhere Gewichtung zu haben als die Wahrscheinlichkeit der Gefäßinvasion.

In der vorliegenden Arbeit lies sich ein geringer Einfluss der Kapillardichte auf die Prognose feststellen. Dabei fiel die Kapillardichte und stieg die Unordnung der Kapillaren mit zunehmendem Tumorstadium und schlechter werdendem klinischen Verlauf. Vielleicht sind nicht die Kapillardichte und die Kapillararchitektur an sich verantwortlich, sondern repräsentieren nur das Bild von mehr oder weniger aggressiv wachsenden Karzinomzellen. Jain (1988) sieht keinen Unterschied im Gefäßdurchmesser zwischen langsam wachsenden Tumoren und nicht tumorös verändertem Gewebe. Im schnell wachsenden Tumor erkennt er dagegen einen größeren Gefäßdurchmesser, eine mangelnde Differenzierung und

überwiegend Sinusoide. Die Neoangiogenese kann mit aggressiv und schnell wachsenden Karzinomzellen nicht mithalten. Endothelzellen haben eine längere Verdopplungszeit als Tumorparenchymzellen (Tannock 1970). Somit haben die Endothelzellen, die durch schnell wachsende Karzinomzellen induziert werden, nicht ausreichend Zeit zu reifen. Darüber hinaus stauen sich durch einen mangelnden Abtransport toxische Stoffwechselprodukte an, so dass die empfindlichen, unreifen Endothelzellen geschädigt werden. Eine geringe Gefäßanzahl, Gefäßabbrüche, fehlende Gefäßmuskulatur, Gefäßkollaps, Endothelzellschwellung, Sinusoide und Gefäßfragmente bestimmen daher eher das histologische Bild sehr aggressiv wachsender Tumoren. Dazu kommt eine mangelnde Basalmembranauskleidung, die eine Migration der Karzinomzellen in das Gefäßsystem und damit in den Körperkreislauf begünstigen.

Letztlich stellt sich die Frage, wie der wachsende Tumor seinen steigenden Substratbedarf deckt, ohne dass die Gefäßanzahl adäquat ansteigt. Nach dem Fick'schen Gesetz ist die Substratversorgung von der Gefäßoberfläche abhängig. Die Gefäßoberfläche wird bestimmt durch die Gefäßanzahl und von dem Diffusionswiderstand beziehungsweise der Permeabilität der Gefäßwand. Es konnte gezeigt werden, dass die Permeabilität in Tumorgefäßen höher ist als in normalem Gewebe (Leunig et al. 1992). Der durch Hypoxie von den Tumor- und Endothelzellen induzierte Angiogenesefaktor VEGF führt als eines der gefäßaktiven Peptide nicht nur zur Neoangiogenese, sondern auch zur Permeabilitätserhöhung der Gefäße (Plate 1993). Somit kann auch ein schneller als sein Kapillarbett wachsender Tumor seinen Substratbedarf initial decken.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, wie bereits oben beschrieben, überwiegend viele Kapillaren und eine geordnete Kapillarstruktur in oberflächlichen Infiltrationsebenen und wenige, ungeordnete Kapillaren in tiefen Infiltrationsebenen. Einerseits kann dieses Phänomen durch den höheren Anteil präformierter, geordneter Gefäße in der Submucosa und vor allem in der Muscularis erklärt werden. Zum anderen weisen im Verlauf des Tiefenwachstums schnell und aggressiv wachsende Karzinomzellklone einen Selektionsvorteil auf, welche die Kapillaren unreif und ungeordnet ausbilden. Die Möglichkeit, dass die Kapillararchitektur und Kapillaranzahl das Bild des Tumorwachstums reflektieren, wird auch durch die Befunde beim Vergleich zwischen Primärtumoren und Lebermetastasen kolorektaler Karzinome nahe gelegt. Die Kapillardichte in den Lebermetastasen von kolorektalen Karzinomen war geringer als in den Primärtumoren. Auch Mooteri et al. (1996) vergleichen die Anzahl der Gefäße in 32 Primärtumoren und in 53

Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms. Diese war, entsprechend unseren Ergebnissen, signifikant geringer in den Lebermetastasen. In den Lebermetastasen finden sich selektiv eher die aggressiven, zur Metastasierung fähigen Tumorzellen, die entscheidend für die Prognose sind, wieder.

Eventuell sind kolorektale Karzinome, obwohl sie die Neoangiogenese induzieren, nicht so stark abhängig von dieser. Die Neoangiogenese ist schon in einer frühen Phase des Tumorwachstums wichtig, aber vielleicht nicht der entscheidende Schritt in der Entstehungskaskade von Metastasen. Um Fernmetastasen zu bilden, müssen die Karzinomzellen einen „Zugang“ zur Blutzirkulation bekommen. Die Zelle darf nicht durch Apoptose untergehen, welche normalerweise nach Trennung von der extrazellulären Matrix induziert wird. Die Karzinomzelle muss einen eventuellen körpereigenen immunreaktiven Angriff überstehen. Sie muss adhäsiv an fernen Orten festhaften und dort das Stroma so umbauen, dass sie invasiv wachsen kann. Diese komplexen Schritte werden von mehreren Faktoren kontrolliert (z.B. zellzyklische Proteine, Apoptose kontrollierende Faktoren, zytotoxische T-Lymphozyten, Oberflächenrezeptoren, Zelladhäsionsmoleküle). Viele von diesen haben sich, zumindest in univariaten Analysen, als prognostische Faktoren erwiesen. Daher ist nicht zu erwarten, dass die Neoangiogenese, auch wenn sie vorhanden ist, der dominante Schritt in dieser Kaskade der Fernmetastasenbildung ist.

1998 untersuchten Banner et al. 22 kolorektale Karzinome im pT3-Stadium, die keine Lymphknoten- und keine Fernmetastasen hatten. Diese Arbeitsgruppe fand keine Korrelation zwischen Kapillardichte und Tumorgröße, Differenzierungsgrad, Tumorsitz, Lymph- oder Veneninvasion sowie dem histologischen Typ. Allerdings konnte bei Patienten mit einem Langzeitüberleben über dem Median eine signifikant geringere Kapillardichte in den Karzinomen gefunden werden. Diese Arbeit legt nahe, dass weiterführende Untersuchungen den prognostischen Einfluss der Kapillaren innerhalb der einzelnen Tumorstadien überprüfen könnten und somit möglicherweise zu einer genaueren Diskriminierung und Therapieoptimierung, vor allem der kolorektalen Karzinome im Stadium II, führen.

5. Zusammenfassung

Die Tumorneoangiogenese gilt als ein wichtiger Faktor für das Wachstum, die Metastasierung und somit auch für den klinischen Verlauf vieler Karzinome.

Zur prognostischen Bedeutung der Kapillardichte im kolorektalen Karzinom gibt es in der Literatur unterschiedliche Aussagen. Arbeiten, die eine hohe Kapillardichte in den Karzinomen mit einer schlechten Prognose assoziieren, stehen Mitteilungen gegenüber, die eine eher niedrige Kapillardichte mit einer schlechten Prognose korrelieren, und schließlich wird in einigen Publikationen kein Einfluss der Tumorkapillarisierung auf dem klinischen Verlauf der Patienten beobachtet. Somit kann der prognostische Stellenwert der Neoangiogenese im kolorektalen Karzinom als nicht eindeutig geklärt gelten.

Die vorliegende Arbeit setzt sich zum Ziel, die Kapillardichte in kolorektalen Karzinomen auf ihre prognostische Relevanz zu überprüfen. Dazu wurden von 173 Patienten, welche in den Jahren 1993 bis 1995 an einem kolorektalen Karzinom erkrankten, die Kapillaren in den Primärtumoren mit Hilfe des Antikörpers gegen Faktor VIII dargestellt, untersucht und die Ergebnisse mit histopathologischen Parametern sowie dem klinischen Verlauf in Beziehung gesetzt. Zur Quantifizierung der Kapillaren diente die Methode von Weidner et al. (1991) in modifizierter Form. Dabei wurden Areale im Bereich der tiefen Infiltrationsfront mit der höchsten Kapillardichte, den so genannten „hot spots“, ausgewertet um mit einer höheren Sicherheit die vom Tumor induzierten Kapillaren beurteilen zu können, welche die Potenz des kolorektalen Karzinoms zur Neoangiogenese ausdrücken.

Ob auch das kapilläre Wachstumsmuster einen Einfluss auf die Prognose hat, konnte durch die Beurteilung der Kapillararchitektur überprüft werden.

Zum Vergleich erfolgte weiterhin eine Untersuchung der Kapillaren in 53 Lebermetastasen kolorektaler Karzinome.

Zur Darstellung einer gesteigerten, tumorinduzierten Kapillarproliferation diente der Vergleich der Endothelzellproliferationsrate in gesunder Mucosa und im Tumorgewebe.

Die Analyse der Beziehung von Kapillaranzahl und Kapillararchitektur zu histopathologischen Tumorparametern sowie zur Überlebenszeit und fernmetastasenfreie Zeit ergab folgende Ergebnisse:

1. Die Kapillaranzahl und die Kapillararchitektur zeigten sich signifikant abhängig von der Infiltrationstiefe und dem Lymphknotenstatus. Weiterhin korreliert die Kapillararchitektur signifikant mit dem Fernmetastasenstatus.

2. In univariaten Analysen erschienen die Kapillaranzahl und die Kapillararchitektur als Prognosefaktor. In multivariaten Analysen zeigte sich dagegen keine unabhängige prognostische Relevanz.
3. Lebermetastasen hatten eine signifikant geringere Kapillardichte im Vergleich zu den Primärtumoren.
4. Die Ergebnisse der Arbeit deuten zwar auf einen geringen prognostischen Einfluss der Kapillardichte und der Kapillararchitektur hin, eine klinische Anwendbarkeit scheint aber vorläufig nicht gegeben.
5. Die Kapillarproliferation war im Tumorgewebe signifikant höher als in der normalen Mucosa.

Die unterschiedlichen Ergebnisse in der Literatur könnten auf die nur geringe prognostische Wertigkeit der Tumorkapillaren, die ausgeprägte Heterogenität der kolorektalen Karzinome und eine untersucherabhängige Methodik zur Quantifizierung der Kapillaren zurückzuführen sein. Vor allem scheint der Ort der Kapillarauszählung aufgrund von bereits vorhandenen Blutgefäßen oder lokalen Entzündungsreaktionen einen wesentlichen Einfluss auf die Ergebnisse zu haben.

Die Kapillaranzahl und die Kapillararchitektur reflektieren eher die Aggressivität des Tumorwachstums. Die Neoangiogenese scheint im kolorektalen Karzinom nicht der entscheidende Schritt in der Metastasierungskaskade zu sein.

Wie in den meisten Studien, die sich mit der Kapillardichte als einem prognostischen Faktor in kolorektalen Karzinomen beschäftigten, zeigte sich auch in dieser Studie die Kapillardichte und die Kapillararchitektur nur in univariaten und nicht in multivariaten Analysen als Einflussfaktor auf den klinischen Verlauf. Somit scheinen die Kapillardichte und die Kapillararchitektur, wenn überhaupt, nur einen geringen, von etablierten Prognosefaktoren abhängigen Einfluss auf den klinischen Verlauf der Patienten zu haben. Die Neoangiogenese ist wahrscheinlich nicht der entscheidende Schritt in der Metastasenentstehung, was eine geringere Kapillardichte in den Lebermetastasen gegenüber den Primärtumoren kolorektaler Karzinome unterstreicht. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit war zwar ein geringer prognostischer Einfluss der Kapillardichte und der Kapillararchitektur vorhanden, aber dieser war wesentlich schwächer als der etablierter Prognosefaktoren. Somit sind die Kapillardichte und Kapillararchitektur nur kritisch und eher zweitrangig für eine Aussage über den klinischen Verlauf der Patienten mit einem kolorektalen Karzinom zu nutzen.

Weiterführende Untersuchungen innerhalb der einzelnen Tumorstadien könnten eventuell zu einer genaueren Differenzierung und ggf. Therapieoptimierung der kolorektalen Karzinome, vor allem im Stadium II, beitragen.

6. Literaturverzeichnis

1. Abdalla SA, Behzad F, Bsharah S, Kumar S, Amini SK, O'Dwyer ST, Haboubi NY.: Prognostic relevance of microvessel density in colorectal tumours. Oncol Rep 1999; 6: 839-42.
2. Ahnen DJ.: Genetics of colon cancer. West J Med 1991; 154: 700-5.
3. Algire GH.: Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. VII. Observations on vascular reactions in destruction of tumor homografts. J Natl Cancer Inst 1954; 15: 483-9.
4. Algire GH, Chalkey HW.: Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wound and tonormal and neoplastic transplants. J Natl Cancer Inst 1945; 6: 73-85.
5. Alles JU, Bosslet K.: Immunohistochemical and immunochemical characterization of a new endothelial cell-specific antigen. J Histochem Cytochem 1986; 34: 209-14.
6. Alles JU, Bosslet K.: Immunocytochemistry of angiosarcomas. A study of 19 cases with special emphasis on the applicability of endothelial cell specific markers to routinely prepared tissues. Am J Clin Pathol 1988; 89: 463-71.
7. Alles JU, Bosslet K, Schachenmayr W.: Hemangioblastoma of the cerebellum--an immunocytochemical study. Clin Neuropathol 1986; 5: 238-41.
8. Armitage NC.: Intervention studies in adenoma patients. World J Surg 1991; 15: 29-34.

9. Banner BF, Whitehouse R, Baker SP, Swanson RS.: Tumor angiogenesis in stage II colorectal carcinoma association with survival.
Am J Clin Pathol 1998; 109: 733-7.
10. Boening H, Wahrendorf J.: Epidemiologie kolorektaler Karzinome.
Internist 1991; 32: 306-14.
11. Bosari S, Lee AK, DeLellis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML.: Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma.
Hum Pathol 1992; 23: 755-61.
12. Bossi P, Viale G, Lee AK, Alfano R, Coggi G, Bosari S.: Angiogenesis in colorectal tumors: microvessel quantitation in adenomas and carcinomas with clinicopathological correlations.
Cancer Res 1995; 55: 5049-53.
13. Bulow S.: Familial polyposis coli.
Dan Med Bull 1987; 34: 1-15.
14. Bunn HF, Poyton RO.: Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia.
Physiol Rev 1996; 76: 839-85.
15. Cawkwell L, Quirke P.: The molecular biology and genetics of the colorectal cancer. In Williams NS.: Colorectal cancer.
Churchill Livingstone London 1996
16. Chalkley HW.: Methoden of the Quantitative Morphologic Analysis of Tissue.
J Natl Cancer 1943; 9: 577-81.
17. Chapuis PH, Dent OF, Fisher R, Newland RC, Pheils MT, Smyth E, Colquhoun K.: A multivariate analysis of clinical and pathological variables in prognosis after resection of large bowel cancer.
Br J Surg 1985; 72: 698-702.

18. Charpin C, Andrac L, Vacheret H, Habib MC, Devictor B, Lavaut MN, Toga M.: Multiparametric evaluation (SAMBA) of growth fraction (monoclonal Ki67) in breast carcinoma tissue sections.
Cancer Res 1988; 48: 4368-74.
19. Coates RJ, Greenberg RS, Liu MT, Correa P, Harlan LC, Reynolds P, Fenoglio-Preiser CM, Haynes MA, Hankey BF, Hunter CP.: Anatomic site distribution of colon cancer by race and other colon cancer risk factors.
Dis Colon Rectum 1995; 38: 42-50.
20. Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP.: American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Consensus Conference: Colorectal Working Group.
Cancer 2000; 88: 1739-57.
21. Connell WR, Sheffield JP, Kamm MA, Ritchie JK, Hawley PR, Lennard-Jones JE.: Lower gastrointestinal malignancy in Crohn's disease.
Gut 1994; 35: 347-52.
22. Coon JS, Landay AL, Weinstein RS.: Biology of disease. Advances in flow cytometry for diagnostic pathology.
Lab Invest 1987; 57: 435-79.
23. Endrich B, Hammersen F, Messmer K.: Microvascular perfusion of malignant tumors--a therapeutic measure for enhancing the hyperthermia effect?
Langenbecks Arch Chir 1988; 373: 12-29.
24. Feldmann HJ, Sievers K, Fuller J, Molls M, Lohr E.: Evaluation of tumor blood perfusion by dynamic MRI and CT in patients undergoing thermoradiotherapy.
Eur J Radiol 1993; 16: 224-9.
25. Ferraroni M, La Vecchia C, D'Avanzo B, Negri E, Franceschi S, Decarli A.: Selected micronutrient intake and the risk of colorectal cancer.
Br J Cancer 1994; 70: 1150-5.

26. Folkman J.: Tumor angiogenesis.
Adv Cancer Res 1974; 19: 331-58.
27. Fox SB, Leek RD, Weekes MP, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL.: Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis.
J Pathol 1995; 177: 275-83.
28. Fregene TA, Khanuja PS, Noto AC, Gehani SK, Van Egmont EM, Luz DA, Pienta KJ.: Tumor-associated angiogenesis in prostate cancer.
Anticancer Res 1993; 13: 2377-81.
29. Fujime M, Lin CW, Prout GR Jr.: Identification of vessels by lectin-immunoperoxidase staining of endothelium: possible applications in urogenital malignancies.
J Urol 1984; 131: 566-70.
30. Gasparini G, Weidner N, Bevilacqua P, Maluta S, Dalla Palma P, Caffo O, Barbareschi M, Boracchi P, Marubini E, Pozza F.: Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma.
J Clin Oncol 1994; 12: 454-66.
31. Gasser A, Jsaak B, Maibach R.: Stadieneinteilung und Prognose des Kolorektalkarzinoms.
Schweiz Med Wschr 1992; 122: 1356-62.
32. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H.: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation.
Int J Cancer 1983; 31: 13-20.
33. Goldman E.: The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system.
Lancet 1907; Band II: 1236-40.

34. Graeven U, Schmiegel W.: Das Kolonkarzinom.
Internist 2000; 41: 876-85
35. Gratzner HG.: Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication.
Science 1982; 218: 474-5.
36. Guillem JG, Brittis NJ.: Addition personal risk factors.
In: Cohnen AM, Winawer SJ.: Cancer of the Colon Rectum and Anus.
McGraw-Hill, New York 1995; 89: 835-42.
37. Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, Krush AJ, Berk T, Cohen Z, Tetu B.: The molecular basis of Turcot's syndrome.
N Engl J Med 1995; 332: 839-47.
38. Hermanek P.: The dysplasia-carcinoma sequence in the colorectum.
Zentralbl Chir 1992; 117: 476-82.
39. Hermanek P Jr, Wiebelt H, Riedl S, Steimner D.: Long-term results of surgical therapy of colon cancer. Results of the Colorectal Cancer Study Group.
Chirurg 1994; 65: 287-97.
40. Hermanek P.: Prognostische Faktoren beim kolorektalen Karzinom.
Zentralbl Chir 1997; 122: 20-5.
41. Hermanek P, Mansmann U, Staimmer DS, Riedl S, Hermanek P.: The German experience: the surgeon as a prognostic factor in colon and rectal cancer surgery.
Surg Oncol Clin N Am 2000; 9: 33-49.
42. Hildenbrand C.: Histomorphologische Untersuchung zur Vaskularisation kolorektaler Karzinome.
Dissertationsschrift der Uni Marburg 1999.

43. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J.: Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression.
Nat Med 1995; 1: 149-53.
44. International Multicenter Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT)
Investigators: Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer.
Lancet 1995; 345: 939-44.
45. Jain RK.: Determinants of tumor blood flow: a review.
Cancer Res 1988; 48: 2641-58.
46. Jain RK.: Haemodynamic and transport barriers to the treatment of solid tumours.
Int J Radiat Biol 1991; 60: 85-100.
47. Jass JR, Aktin WS, Cuzick J, Bussey HJ, Morson BC, Northover JM.: The grading of rectal cancer: historical perspectives and a multivariate analysis of 447 cases.
Histopathology 1986; 10: 437-59.
48. Kinzler KW, Vogelstein B.: The Genetic Basis of Human Cancer.
McGraw-Hill, New York 1998; 525-32.
49. Köller U, Stockinger H, Majdic O, Bettelheim P, Knapp W.: A rapid and simple immunoperoxidase staining procedure for blood and bone marrow samples.
J Immunol Methods 1986; 86: 75-81.
50. Konerding MA, Fait E, Gaumann A.: 3D microvascular architecture of pre-cancerous lesions and invasive carcinomas of the colon.
Br J Cancer 2001; 84: 1354-62.
51. Korenaga D, Ueo H, Mochida K, Kusumoto T, Baba H, Tamura S, Moriguchi S, Sugimachi K.: Prognostic factors in Japanese patients with colorectal cancer: the significance of large bowel obstruction--univariate and multivariate analyses.
J Surg Oncol 1991; 47: 188-92.

52. Krebs in Deutschland. Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogenes Krebsregister in Deutschland.
2. aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken 1999
53. Laubenbacher C, Schwaiger M.: The potential role of positron emission tomography in investigation of microenvironment.
In: Molls M, Vaupel, P.: Blood perfusion and microenvironment of human tumors.
Springer, Berlin 1998; 161-91.
54. Leunig M, Yuan F, Menger M D, Boucher Y, Goetz A E, Messmer K, Jain R K.:
Angiogenesis, microvascular architecture, microhemodynamics and interstitial fluid pressure during early growth of human adenocarcinoma LS 174t in SCID mice.
Cancer Res 1992; 52: 6553-60.
55. Lindmark G, Gerdin B, Sundberg C, Pahlman L, Bergstrom R, Glimelius B.: Prognostic significance of the microvascular count in colorectal cancer.
J Clin Oncol 1996; 14: 2400-3.
56. Little D, Said JW, Siegel RJ, Fealy M, Fishbein MC.: Endothelial cell markers in vascular neoplasms: an immunohistochemical study comparing factor VIII-related antigen, blood group specific antigens, 6-keto-PGF1 alpha, and Ulex europaeus 1 lectin.
J Pathol 1986; 149: 89-95.
57. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR.: Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary colorectal cancer: an updated review.
Gastroenterology 1993; 104: 1535-49.
58. Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA.: Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer.
Lancet 1992; 340: 145-6.

59. Macchiarini P, Fontanini G, Dulmet E.: Angiogenesis: an indicator of metatasis in non-small-cell lung cancer invading the thoracic inlet.
Ann Thorac Surg 1994; 57: 1534-9.
60. Mamounas E, Wieand S, Wolmark N, Bear HD, Atkins JN, Song K, Jones J, Rockette H.: Comparative efficacy of adjuvant chemotherapy in patients with Dukes' B versus Dukes' C colon cancer: results from four National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project adjuvant studies (C-01, C-02, C-03, and C-04).
J Clin Oncol 1999; 17: 1349-55.
61. McFarlane MJ, Welch KE.: Gallstones, cholecystectomy, and colorectal cancer.
Am J Gastroenterol 1993; 88: 1994-9.
62. Matsumura K, Tsuji T, Shinozaki F, Sasaki K, Takahashi M.: Immunohistochemical determination of growth fraction in human tumors.
Pathol Res Pract 1989; 184: 609-13.
63. Matsushita Y, Yonezawa S, Nakamura T, Shimizu S, Ozawa M, Muramatsu T, Sato E.: Carcinoma-specific *Ulex europaeus* agglutinin-I binding glycoproteins of human colorectal carcinoma and its relation to carcinoembryonic antigen.
J Natl Cancer Inst 1985; 75: 219-26.
64. Mazure NM, Chen EY, Yeh P, Laderoute KR, Giaccia AJ.: Oncogenic transformation and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression.
Cancer Res 1996; 56: 3436-40.
65. Mendelson ML.: The growth fraction: a new concept applied to tumors.
Science 1960; 132: 1496.
66. Midgley R, Kerr D.: Towards post-genomic investigation of colorectal cancer.
Lancet 2000; 355: 669-70.

67. Miettinen M, Holthofer H, Lehto VP, Miettinen A, Virtanen I.: Ulex europaeus I lectin as a marker for tumors derived from endothelial cells.
Am J Clin Pathol 1983; 79: 32-6.
68. Mlynec ML, van Beunigen D, Leder LD, Streffer C.: Measurement of the grade of vascularisation in histological tumour tissue sections.
Br J Cancer 1985; 52: 945-8.
69. Mooteri S, Rubin D, Leurgans S, Jakate S, Drab E, Saclarides T.:
Tumor Angiogenesis in Primary and Metastatic Colorectal Cancer.
Dis of the Colon and Rectum 1996; 39: 1073-80.
70. Mukai K, Rosai J, Burgdorf WH.: Localization of factor VIII-related antigen in vascular endothelial cells using an immunoperoxidase method.
Am J Surg Pathol 1980; 4: 273-6.
71. Nelson RL, Persky V, Turyk M.: Determination of factors responsible for the declining incidence of colorectal cancer.
Dis Colon Rectum 1999; 42: 741-52.
72. Neugut AI, Jacobson JS, De Vivo I.: Epidemiology of colorectal adenomatous polyps.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1993; 2: 159-76.
73. Ordonez NG, Batsakis JG.: Comparison of Ulex europaeus I lectin and factor VIII-related antigen in vascular lesions.
Arch Pathol Lab Med 1984; 108: 129-32.
74. Papadimitriou JM, Woods AE.: Structural and functional characteristics of the microcirculation in neoplasms.
J Path 1975; 116: 65-72.
75. Pavlopoulos PM, Konstantinidou AE, Agapitos E, Kavantzias N, Nikolopoulou P, Davaris P.: A morphometric study of neovascularization in colorectal carcinoma.
Cancer 1998; 83: 2067-75.

76. Pezzella F, Pastorino U, Tagliabue E, Andreola S, Sozzi G, Gasparini G, Menard S, Gatter KC, Harris AL, Fox S, Buyse M, Pilotti S, Pierotti M, Rilke F.: Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am J Pathol* 1997; 151: 1417-23.
77. Plate KH.: Angiogenese und Anti-Angiogenese. *Deutsches Ärzteblatt* 1993; 90: 2211-8.
78. Pluda JM.: Tumor-associated angiogenesis: mechanisms, clinical implications, and therapeutic strategies. *Semin Oncol* 1997; 24: 203-18.
79. Polverini PJ, Leibovich SJ.: Induction of neovascularization in vivo and endothelial proliferation in vitro by tumor-associated macrophages. *Lab Invest* 1984; 51: 635-42.
80. Porschen R, Langen C, Kriegel A, Lohe B, Borchard F.: Critical evaluation of histochemical and immunochemical methods for the demonstration of vascular supply in rectal and oesophageal cancer. *Br J Cancer* 1989; 60: 299-302.
81. Porschen R, Strohmeyer G.: Risk of dysplasia and carcinoma in ulcerative colitis. *Dtsch Med Wochenschr* 1991; 16: 1682-8.
82. Prall F, Dührkop T, Weirich V, Ostwald C, Lenz P, Nizze H, Barten M.: Prognostic role of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in stage III colorectal cancer with and without microsatellite instability. *Hum Pathol* 2004; 35: 808-16.
83. Quinn CM, Wright NA.: The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J Pathol* 1990; 160: 93-102.

84. Raymond WA, Leong AS-Y, Bolt JW, Milio J, Jose JS.: Growth fractions in human prostatic carcinoma determined by Ki 67 immunostaining.
J Pathol 1988; 156: 161-7.
85. Riede UN, Schaefer HE.: Allgemeine und spezielle Pathologie.
Georg Thieme, New York 1993
86. Rieken EO.: Kolonkarzinome und maligne Geschwülste des Kolons.
In: Classen, M, Diehl, V, Kochsiek, K.: Innere Medizin, Kap. 11.4.8.
Urban & Schwarzenberg, München 1993; 551-3.
87. Rubin P, Casarett G.: Microcirculation of tumors. Part I. Anatomy, function, and necrosis.
Clin Radiol 1966; 17: 220-9.
88. Rubin P, Casarett G.: Microcirculation of tumors. Part II. The supervascularized state of irradiated regressing tumors.
Clin Radiol 1966; 17: 346-55.
89. Ruiter DJ, Schlingemann RO, Rietveld FJ, de Waal RM.: Monoclonal antibody-defined human endothelial antigens as vascular markers.
J Invest Dermatol 1989; 93: 25-32.
90. Saclarides TJ, Speziale NJ, Drab E, Szeluga DJ, Rubin DB.: Tumor angiogenesis and rectal carcinoma.
Dis Colon Rectum 1994; 37: 921-6.
91. Schlingemann RO, Dingjan GM, Emeis JJ, Blok J, Warnaar SO, Ruiter DJ.: Monoclonal antibody PAL-E specific for endothelium.
Lab Invest 1985; 52: 71-6.
92. Schalhorn A, Jauch KW in: Wilmanns W, Huhn d, K, Hrsg.: Internistische Onkologie.
Thieme 2. Aufl, Stuttgart 2000; 560-91.

93. Seifert E.: Kolorektales Karzinom – Diagnostische Erfordernisse aus klinischer Sicht.
Röntgenblätter 1988; 41: 176-9.

94. Shields HM, Bates ML, Yedlin ST, Best CJ.: Distribution of immunoreactive alkaline phosphatase in the adult rat ileum by immunoperoxidase staining at the light microscopic level.
Gastroenterology 1984; 87: 827-35.

95. Sohn C, Grischke EM, Wallwiener D, Kaufmann M, von Fournier D, Bastert G.:
Ultrasound diagnosis of blood flow in benign and malignant breast tumors.
Geburtshilfe Frauenheilkd 1992; 52: 397-403.

96. Sorenson AW, Slattery ML, Ford MH.: Calcium and colon cancer: a review.
Nutr Cancer 1988; 11: 135-45.

97. Srivastava A, Laidler P, Davies RP, Horgan K, Hughes LE.: The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. A quantitative histologic study.
Am J Pathol 1988; 133: 419-23.

98. Statistisches Bundesamt: Statistisches Jahrbuch.
Metzler-Poeschel, Stuttgart 1998

99. Steele G, Mayer R.: Adenocarcinoma of the colon and rectum.
In: Haubrich WS, Schaffner F.: Bockus Gastroenterology.
WB Saunders, Philadelphia 1995; 124-39.

100. Sternberger LA, Sternberger NH.: The unlabeled antibody method: comparison of peroxidase-antiperoxidase with avidin-biotin complex by a new method of quantification.
J Histochem Cytochem 1986; 34: 599-605.

101. Sternfeld T, Foss HD, Kruschewski M, Runkel N.: The prognostic significance of tumor vascularization in patients with localized colorectal cancer.
Int J Colorectal Dis 1999; 14: 272-6.
102. Stutte HJ.: Hexazotiertes Triamino-Tritolyl-Methanchlorid (Neufuchsin) als Kupplungssalz in der Ferment-Histochemie.
Histochemie 1967; 8: 327.
103. Takebayashi Y, Aklyama S, Yamada K, Akiba S, Aikou T.: Angiogenesis as an unfavorable prognostic factor in human colorectal carcinoma.
Cancer 1996; 78: 226-31.
104. Tanaka Y.: Regional tumor blood flow and radiosensitivity.
In: Sugahara T.: Fraction size in radiobiology and radiotherapy.
Urban & Schwarzenberg, München
Igaku Shoin Ltd, Tokyo 1974; 13-26.
105. Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Lu C, Kitaoka A, Matsuyama K.: Tumor angiogenesis and mode of metastasis in patients with colorectal cancer.
Cancer Res 1997; 57: 1043-6.
106. Tannock IF.: The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour.
Br J Cancer 1968; 22: 258-73.
107. Tannock IF.: Population kinetics of carcinoma cells, capillary endothelial cells, and fibroblasts in a transplanted mouse mammary tumor.
Cancer Res 1970; 30: 2470-6.
108. Tannock IF.: Cell kinetics and chemotherapy: a critical review.
Cancer Treat Rep 1978; 62: 1117-33.

109. Tannock IF, Steel GG.: Quantitative techniques for study of the anatomy and function of small blood vessels in tumors.
J Natl Cancer Inst 1969; 42: 771-82.
110. Taylor CR.: Immunoperoxidase techniques: practical and theoretical aspects.
Arch Pathol Lab Med 1978; 102: 113-21.
111. Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW Jr.: Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer.
N Engl J Med 1991; 325: 1593-6.
112. Tomisaki S, Ohno S, Ichiyoshi Y, Kuwano H, Maehara Y, Sugimachi K.: Microvessel quantification and its possible relation with liver metastasis in colorectal cancer.
Cancer 1996; 77: 1722-8.
113. Vacca A, Ribatti D, Roncali L, Lospalluti M, Serio G, Carrel S, Dammacco F.: Melanocyte tumor progression is associated with changes in angiogenesis and expression of the 67-kilodalton laminin receptor.
Cancer 1993; 72: 455-61.
114. Vermeulen PB, Verhoeven D, Fierens H, Hubens G, Goovaerts G, Van Marck E, De Bruijn EA, Van Oosterom AT, Dirix LY.: Microvessel quantification in primary colorectal carcinoma: an immunohistochemical study.
Br J Cancer 1995; 71: 340-3.
115. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL.: Genetic alterations during colorectal-tumor development.
N Engl J Med 1988; 319: 525-32.
116. Warren BA.: The vascular morphology of tumors
In: Peterson HJ.: Tumor blood circulation: Angiogenesis, vascular morphology and blood flow of experimental and human tumors. Cap. 1.
Boca Raton, CRC Press, Florida 1979; 1-47.

117. Weibel ER.: Stereological methods vol. 1 – practical methods for biological morphometry.
Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco 1979.
118. Weibel ER.: Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs.
Lab Invest 1963; 12: 131-55.
120. Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G.: Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma.
J Natl Cancer Inst 1992; 84: 1875-87.
121. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J.: Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma.
N Engl J Med 1991; 324: 1-8.
122. White E, Jacobs EL, Daling JR.: Physical activity in relation to colon cancer in middleaged men and women.
Am J Epidemiol 1996; 144: 42-52.
123. Wolmark N, Rockette H, Mamounas E, Jones J, Wieand S, Wickerham DL, Bear HD, Atkins JN, Dimitrov NV, Glass AG, Fisher ER, Fisher B.: Clinical trial to assess the relative efficacy of fluorouracil, leucovorin and levamosole in patients with Duces B and C carcinoma of the colon: Results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project-Protocol. C-04.
J Clin Oncol 1999; 17: 3553-9.
124. Wright NA, Alison M.: The biology of epithelial cell population.
Clarendon Press Oxford 1984; 1.
125. Yamaura H, Sato H.: Quantitative studies on the developing vascular system of rat hepatoma.
J Natl Cancer Inst 1974; 53: 1229-40.

Anhang

Thesen

1. Die prognostische Wertigkeit der Neoangiogenese im kolorektalen Karzinom wird in der Literatur kontrovers diskutiert.
2. Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss der intratumoralen Vaskularisation kolorektaler Karzinome im Vergleich mit histopathologische Befunden und deren Variablen auf den klinischen Verlauf zu untersuchen.
3. Zu diesem Zweck wurden die Anzahl der Kapillaren und die Kapillararchitektur von 173 kolorektalen Karzinomen mit Hilfe des Antikörpers gegen Faktor VIII dargestellt und nach der Methode von Weidner et al. beurteilt. Die Methode nach Weidner et al. wurde dahingehend modifiziert, dass die Gefäße im Bereich der tiefen Infiltrationsfront Beachtung fanden.
4. Die Untersuchung der kolorektalen Karzinome in dieser Studie zeigte eine ausgeprägte, intratumorale und intertumorale Heterogenität der Kapillardichte und Kapillararchitektur. Somit ist eine genaue Definition des Auswertungsortes innerhalb eines Tumors von wesentlicher Bedeutung.
5. Mit zunehmender Infiltrationstiefe der kolorektalen Karzinome nahm die Anzahl der Kapillaren in den „hot spots“ ab. Dieser Abfall der Kapillardichte war unter Berücksichtigung der pT-Einteilung nach UICC nicht signifikant. Stellt man allerdings den auf die Darmwand beschränkten kolorektalen Karzinome (pT1 und pT2 nach UICC) die Darmwand überschreitenden Tumoren gegenüber (pT3 und pT4 nach UICC), so lies sich eine signifikant niedrigere Kapillardichte bei den letztgenannten Tumoren feststellen.
6. Karzinome des Kolons und des Rektums, welche zum Zeitpunkt der Operation noch keine Lymphknotenmetastasen zeigten, hatten eine signifikant höhere Kapillardichte als Karzinome mit Lymphknotenmetastasen.
7. Es fanden sich weniger Kapillaren in den kolorektalen Karzinomen mit synchronen Fernmetastasen als in den nicht metastasierten Karzinomen. Dieser Unterschied war

aber bei einer Anzahl der Patienten mit metachronen Metastasen von $n = 23$ nicht signifikant.

8. Nicht vollständig resezierte kolorektale Karzinome hatten eine signifikant niedrigere Kapillardichte als vollständig entfernte Karzinome.
9. Kolorektale Karzinome mit einer starken Unordnung der Kapillaren ließen signifikant weniger Kapillaren als Tumoren mit geordnetem Kapillarmuster erkennen. Es scheint, dass aggressiv wachsende kolorektale Karzinome die Neoangiogenese zwar induzieren, aber diese sich im Gegensatz zum Tumorzellwachstum nur unvollständig ausprägt.
10. Karzinome des Kolons und des Rektums mit einem geringeren Kapillarisierungsgrad korrelierten mit einer kürzeren Überlebenszeit und einem häufigeren Auftreten von Fernmetastasen als kolorektale Karzinome mit hohem Kapillarisierungsgrad. Diese signifikante Unterscheidung konnte nur in univariaten Analysen beobachtet werden.
11. Die Kapillararchitektur zeigte sich signifikant abhängig von der Infiltrationstiefe, Lymphknoten-, Fernmetastasen- und Residualtumorstatus. Mit zunehmender Infiltrationstiefe nahm die Unordnung der Kapillararchitektur zu. Zum Zeitpunkt der Operation bereits lymphogen metastasierte kolorektale Karzinome hatten eine höhere Kapillarunordnung als Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen. Synchron metastasierte Karzinome des Kolons und des Rektums zeigten eine geringere Kapillarordnung als nicht metastasierte kolorektale Karzinome. Nicht vollständig resezierte kolorektale Karzinome ließen eine geringere Kapillarordnung erkennen als vollständig resezierte.
12. Keine Abhängigkeit zeigten die Kapillardichte und die Kapillararchitektur vom Differenzierungsgrad des Tumors.
13. In univariaten Analysen stellte sich die Kapillararchitektur als ein prognostisch relevantes Merkmal dar. Mit zunehmender Unordnung der Kapillaren in den kolorektalen Karzinomen verkürzte sich die Überlebenszeit und die Wahrscheinlichkeit, metachrone Metastasen auszubilden, erhöhte sich.

14. Die Kapillardichte in den Primärtumoren kolorektaler Karzinome war signifikant höher als die in den Lebermetastasen, was die Selektion aggressiv wachsender Tumorzellklone reflektieren könnte. Des weiteren deutet es darauf hin, dass die Neoangiogenese nicht der entscheidende Schritt zur Metastasierung der kolorektalen Karzinome ist.
15. Die Proliferationsrate in den Endothelzellen innerhalb des Tumors stellte sich signifikant höher als die Endothelzellproliferationsrate in der nicht tumorös veränderten Mucosa dar. Dies zeigt, dass das kolorektale Karzinom zur Neoangiogenese fähig ist.
16. Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den Arbeiten, welche sich mit der prognostischen Wertigkeit der Kapillarisation im kolorektalen Karzinom beschäftigen, könnten durch die komplexe und wenig standardisierte Methodik begründet sein. Vor allem scheint der Ort der Kapillarauszählung aufgrund der ausgeprägten Heterogenität der Kapillarverteilung sowie vorbestehender Blutgefäße oder lokaler Entzündungsreaktionen einen wesentlichen Einfluss auf die Ergebnisse zu haben.
17. Die Kapillardichte und die Kapillararchitektur könnten die Aggressivität des Tumorwachstums kolorektaler Karzinome repräsentieren.
18. Ein Einfluss der Kapillardichte und der Kapillararchitektur auf die Prognose der Karzinomkrankung stellte sich nur in univariaten, nicht aber in multivariaten Analysen, als ein unabhängiger Prognosefaktor heraus. Somit scheint die prognostische Wertigkeit nur gering zu sein.
19. Eine weiterführende Untersuchung innerhalb der einzelnen Tumorstadien könnte zur Diskriminierung und Therapieoptimierung, vor allem des sehr heterogenen Stadium II, beitragen.

Publikation

Prall F, Gringmuth U, Nizze H, Barten M.: Microvessel densities and microvascular architecture in colorectal carcinomas and their liver metastases: significant correlation of high microvessel densities with better survival.
Histopathology 2003; 42: 482-91.

Immunhistochemische Nachweisreaktion

Paraffinblöcke wurden geschnitten, dann aus einem 40°C warmen Wasserbecken auf den Objektträger aufgelegt und mittels Xylol entparaffinisiert.

Arbeitsschritte der APAAP-Methode:

1. Herauslösen des Wachses aus den Paraffinschnitten	10 min. Inkubation in Xylol 10 min. Inkubation in Aceton 10 min. Inkubation in Aceton-Waschpufferlösung 10 min. Inkubation in Wasser
2. Demaskierung der Antigene (10 min.) bei 37°C	Faktor VIII: mit 0,1% Protease gelöst in Aqua dest Ki67: 5 min. Inkubation im Dampfdrucktopf mit TEC-Puffer pH 7,8
3. Erste Inkubation mit dem primären Antikörper (30 min.)	Verdünnungslösung: 80 ml Aqua dest + 10 ml RPMI (5mg/l PhenolRed, w/o L-Glutamin und w/o NaHCO ₃) + 10 ml inaktiviertes Rinderserum zur Bindung von unspezifischen Antikörpern + Natriumacid (NaN ₃) zur Konservierung Faktor VIII: 1:1000 Ki67: 1:200
4. Inkubation der Zwischenbrücke 30 min.	Zwischenbrückenantikörper: Anti-Rabbit Ig (DAKO M 0737) Verhältnis von Zwischenbrückenantikörper zur Verdünnungslösung: Faktor VIII: 1:20 {45 ml Verdünnungslösung (vgl. 3.) zusätzlich mit 5 ml Humanserum versetzt}
5. Inkubation mit dem Brückenantikörper 30 min.	Brückenantikörper: Rabbit-anti-mouse (DAKO Z 0259) Verhältnis von Brückenantikörper zur Verdünnungslösung: 1:100 {45 ml Verdünnungslösung (vgl. 3.) zusätzlich mit 5ml Humanserum versetzt}

6. Inkubation mit dem APAAP-Komplex 30 min.	Verhältnis von APAAP-Komplex zur Verdünnungslösung: 1:100
7. Wiederholung	10 min. Inkubation mit dem Brückenantikörper, 10 min. Inkubation mit dem APAAP-Komplex
8. Entwicklung (10-20 min.)	1. Natriumnitrit (12,5 mg) in Aqua bi dest (375 mül) lösen und zu 2. Neufuchsin (125 mül) geben und zu 3. Entwicklungspuffer (43,5 ml) + Propandiol (15,5 ml) + Levamisol-HCL (25 mg) geben und zu 4. Naphtol AS-BI Phosphat (31,5 mg) in Dimethylformamid (375 mül) gelöst geben 5. filtrieren 6. 2 × mit Leitungswasser spülen
9. Anfärbung	Faktor VIII: 3 min. Kernanfärbung mit Hämalaun Ki67: 1 min. Kernfärbung mit Hämalaun Im warmen Wasser bläuen Alkohol-Xylol eindecken Pertex-Eindeckmedium
Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten erfolgt eine dreimalige Spülung mit Leitungswasser.	

Punkt 4 wird nur für den polyklonalen Faktor VIII-Antikörper zur Verbindung mit dem monoklonalen Brücken-Antikörper benötigt.

Punkt 7 wird nicht für die Faktor VIII-Färbung durchgeführt.

Abkürzungs- und Begriffsverzeichnis

ANOVA	: ANalysis Of VAriance
AP	: Alkalische Phosphatase
APC	: Adenomatous Polyposis Coli
APAAP	: Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase
BrdU	: Bromdesoxyuridin
bzw	: beziehungsweise
CD	: Cluster of Differentiation
CEA	: Carcino Embrionales Antigen

DCC	: Deleted in Colorectal Carcinoma
DNA	: DesoxiriboNucleid Acid
d.h.	: das heißt
et al	: und andere
F VIII	: Faktor 8
FGF	: Fibroblastic Growth Factor
G	: Grading = Differenzierungsgrad
G1-Phase	: Gap Phase
GAP	: GTPase Aktivierende Protein
hif	: hypoxia inducible factor
IgG	: Immunglobulin G
H ₂ O ₂	: Wasserstoffperoxid
hot spot	: Ort der höchsten Gefäßdichte
HS	: hot spot = Ort der höchsten Gefäßdichte
HTLI	: Human Thymidin Labelling Index
IMPACT B2	: International Multicentre Pooled Analysis of B2 Colon Cancer Trials
K-ras	: Kirsten ras Onkogen
kum	: kumulativ
M	: Metastasen
mAK	: monoklonaler Antikörper
max	: maximal
MCC	: Mutated in Colorectal Carcinoma
min	: Minute(n)
Min	: minimal
MX	: Vorhandensein von Metastasen kann nicht beurteilt werden
n	: Anzahl
NaN ₃	: Natriumacid
NaHCO	: Natriumhydrogencarbonat
n.s	: nicht signifikant
p	: Irrtumswahrscheinlichkeit der Signifikanzprüfung
PAP	: Peroxidase Antiperoxidase
PD-ECGF	: Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor
pH	: potentia Hydrogenii

pN	: pathohistologisch beurteilte Lymphknoten
POX	: Peroxidase
pR	: pathohistologisch nachgewiesenes Resttumorgewebe nach Resektion
prolif	: proliferierender
pT	: pathohistologisch beurteilte Tumoreindringtiefe
R	: Residual
rAg	: releasing Antigen
RNA	: RiboNucleic Acid
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
S-Phase	: Synthesis Phase
SD	: Standartabweichung
SPSS	: Statistik Programm System für die Sozialwissenschaften
TGFβ	: Transformin Growth Factor beta
TNM	: Tumor Nodus Metastasis
TVA	: Total Vascular Area
UEA	: Ulex Europeaus Agglutinin
UICC	: International Union Against Cancer
VEGF	: Vascular Endothel Growth Factor
VPF	: Vascular Permeability Factor
vgl	: vergleiche
vs	: versus
zB	: zum Beispiel

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die eingereichte Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Barten für die Bereitstellung dieser Arbeit bedanken. Herrn PD Dr. med. Prall danke ich für die gute Zusammenarbeit und die hilfreichen Tipps zur Bearbeitung des Themas. Ganz besonderer Dank geht an Frau Thiemann und die Mitarbeiter des histopathologischen Labors, ohne deren jahrelange Erfahrung eine so hohe Qualität der histopathologischen Schnittpräparate nicht möglich gewesen wäre. Nicht nur für den Exkurs in die Geschichte der Rostocker Pathologie, sondern auch für die exzellenten Bildaufnahmen danke ich Frau Lukat.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung während meines Studiums bedanken. Dank gilt auch meiner Freundin Johanna sowie Kristine und Lutz.